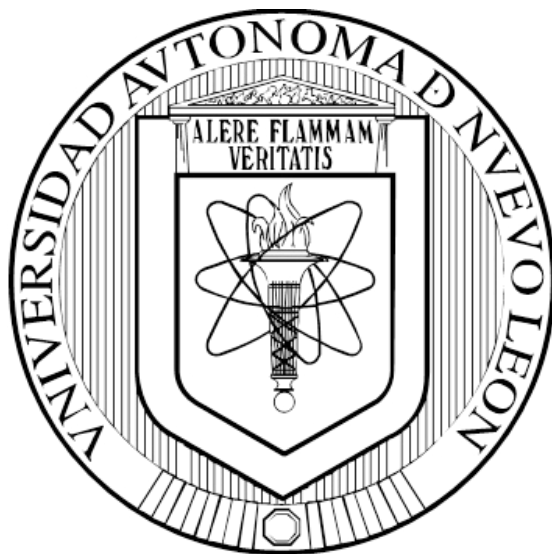


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA Y CITOTÓXICA
DE MOLÉCULAS CON AFINIDAD AL SITIO DE UNIÓN DE
LA COLCHICINA EN LA β -TUBULINA**

POR

ELIZETH PIOQUINTO AVILA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN FARMACIA**

JULIO, 2017

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA Y CITOTÓXICA
DE MOLÉCULAS CON AFINIDAD AL SITIO DE UNIÓN DE
LA COLCHICINA EN LA β -TUBULINA”**

Revisión de la tesis:

Dr. Eder Ubaldo Arredondo Espinoza
Director de Tesis

Dra. Mónica Azucena Ramírez Cabrera
Co-Directora de Tesis

Dra. Elida Marcela Aguilar Bravo
Comité Tutorial

Dra. María del Rosario González González
Comité Tutorial

Dr. Isaías Balderas Rentería
Comité Tutorial

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA Y CITOTÓXICA
DE MOLÉCULAS CON AFINIDAD AL SITIO DE UNIÓN DE
LA COLCHICINA EN LA β -TUBULINA”**

Aprobado por Comité de Tesis:

Dr. Eder Ubaldo Arredondo Espinoza
Presidente

Dr. Isaías Balderas Rentería
Secretario

Dra. María del Rosario González González
Vocal

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez
Sub-Directora de Estudios de Posgrado

RESUMEN

Q.F.B. Elizeth Pioquinto Avila

Universidad Autónoma de Nuevo León

Fecha de Graduación: Julio 2017

Facultad de Ciencias Químicas

Título del Estudio: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA Y CITOTÓXICA DE MOLÉCULAS CON AFINIDAD AL SITIO DE UNIÓN DE LA COLCHICINA EN LA β -TUBULINA.

Número de páginas: 84

de Maestría en Ciencias con Orientación en Farmacia

Candidato para el grado

Propósito y Método del Estudio: El cáncer es la segunda causa de mortalidad a nivel mundial. La quimioterapia es una de las principales modalidades de tratamiento para el cáncer. Los antimetabólicos interrumpen la dinámica de los microtúbulos, estos actúan uniéndose a la proteína heterodimérica tubulina. Los agentes de unión a los microtúbulos inhiben la proliferación celular y promueven la muerte celular, al suprimir la dinámica de los microtúbulos. En los últimos años varias moléculas se han sometido a un screening virtual con la finalidad de conocer la afinidad al sitio de unión de la colchicina en la tubulina.

Es por ello que la finalidad de la presente investigación fue evaluar la actividad citotóxica, anticancerígena, la inducción de apoptosis de tres compuestos que son afines al sitio de unión de la colchicina en la tubulina y el análisis de expresión del compuesto que presentó actividad anticancerígena. Los compuestos a evaluar se obtuvieron de las compañías MolMall, Mcule y MolPort. La evaluación de la actividad anticancerígena y citotóxica se llevó a cabo por la técnica de WST-1, se realizaron por triplicado en tres ensayos independientes y la determinación de la actividad apoptótica mediante el kit de la caspasa-3 con el sustrato Z-DEVD-R110. La exposición de los compuestos fue por 48 horas,

utilizando un rango de concentraciones de 0.112-7.2 μ M. La actividad apoptótica se realizó como lo indica el Kit; las células tratadas se dejaron durante 7 horas a una concentración de 7.2 μ M. El análisis de la expresión génica fue con G-898 y colchicina se realizó de manera individual a la concentración de 7.2 μ M. La extracción del ARN se llevó a cabo de manera convencional con la técnica de trizol: el análisis de los datos fue por medio de la base de datos DAVID para la determinación de las rutas biológicas.

Contribuciones y Conclusiones: El compuesto G-898 fue el que presentó mayor citotoxicidad en comparación con G-311 y G-309. Así mismo obtuvo porcentajes de efecto antiproliferativo muy similares al fármaco de referencia colchicina, por tal motivo, consideramos profundizar en su estudio de actividad biológica. El compuesto G-311 es el que mostró actividad apoptótica incluso mayor al control positivo podofilotoxina. Con respecto al análisis de expresión el compuesto G-898 no es comparativo a colchicina, debido a que las vías biológicas expresadas difieren, sin embargo, algunas de las vías encontradas con G-898 pueden inducir de manera indirecta procesos de apoptosis, antiproliferativos o interrupción de los procesos de división celular.

Firma del asesor: _____

Dr. Eder Ubaldo Arredondo Espinoza

DEDICATORIA

A Mi Mamá

A Mamá Mane y Papá Timo

A Mi Hermano

A Mariana, Luis y Carol

A Mi Familia

A Mis Amigos

AGRADECIMIENTOS

Al **Laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica** por todo el apoyo brindado y darme la oportunidad de trabajar en dichas instalaciones durante estos dos años.

A la **Facultad de Ciencias Químicas** por aceptarme en la institución y permitir realizar mis estudios en el posgrado.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por su apoyo económico durante todo este tiempo.

Al **Dr. Eder Ubaldo Arredondo Espinoza** por darme la oportunidad de ser su alumna, brindarme su confianza y sobre todo por compartir sus conocimientos. Por los consejos y por otorgarme todo su apoyo de manera incondicional ante todas las situaciones presentadas a lo largo de esta etapa. Es un excelente asesor, muchas gracias Dr. Eder.

Al **Dr. Isaías Balderas Rentería** por darme nuevamente la oportunidad de trabajar en el laboratorio, por la confianza otorgada, y sobre todo por compartir sus conocimientos. Así mismo agradezco todo el apoyo que recibí ante la situación presentada. Gracias.

A la **Dra. Mónica Azucena Ramírez Cabrera** por los consejos, recomendaciones y el apoyo otorgado ante toda situación presentada. Por siempre estar al pendiente de los avances. Y por todas las atenciones que recibí de su parte, estoy muy agradecida.

Al comité tutorial: **Dra. María del Rosario González González y Dra. Elida Marcela Aguilar Bravo** por la disponibilidad, apoyo, sugerencias brindadas para la realización de esta tesis.

A la **Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas** por todo el apoyo brindado desde el inicio del posgrado, por las sugerencias para la mejora de este trabajo, por el apoyo moral. Muchas gracias Dra. Lucí.

A mis compañeros del **INGGEN**: Jorge Solís, Adriana Hernández, Jorge Zacatecas, Sonia Montero, Jesús Velez, Evelyn Martínez, Eiber Briones, Silvana Vázquez, Ismael Rodríguez, Jorge Guía, Luis Carlos Olvera, Yuridia Torres, Alejandra Ortega, Annel Cruz, Diego Jaramillo, Tania Rico, Ceci Jaramillo, Lizeth Cabrera, Alan Gauna por su apoyo, consejos, amistad y por la buena convivencia en el laboratorio, muchas gracias.

A mis compañeros de **Generación**: Cynthia González, Rodolfo Guerrero, Erika Hernández, Jorge Hernández y Felipe Nataren, gracias por su amistad, apoyo, consejos y por todos los momentos que convivimos.

Al **Dr. Donaciano Reyes Flores** por el apoyo que me brindo, por compartir sus conocimientos. Gracias por darme ese impulso hacia el área de investigación, sin esa ayuda y enseñanza no hubiera sido posible este logro.

A mis amigos de la **UACN**: María Hernández, Jorge Solís, María Paula, Christian Valdivia, Rigoberto Villanueva, Felipe Nataren, Ángel Zeferino, Areli Asunción, Yumara Cardona, Nayelli González, Mayra Santana, Ana Zazocoteco, Irving García a todos y cada uno de ustedes por la amistad brindada, los días de estudio y por seguir apoyándome en la etapa de la maestría, gracias.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
RESUMEN.....	IV
DEDICATORIA.....	VI
AGRADECIMIENTOS	VII
TABLA DE CONTENIDO.....	X
LISTA DE TABLAS	XIII
LISTA DE FIGURAS	XV
NOMENCLATURA.....	XVI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. EL CÁNCER.....	2
1.2. GENÉTICA DEL CÁNCER.....	2
1.3. CAUSAS DE CÁNCER.....	7
1.4. TERAPIA ANTINEOPLÁSICA.....	10
1.5. MICROTÚBULOS COMO BLANCOS TERAPÉUTICOS EN EL CÁNCER.....	14
1.5.1. Ensamble y composición de microtúbulos.....	14
1.5.2. Dinámica de los microtúbulos.....	15
1.5.3. Proteínas reguladoras de microtúbulos.....	18
1.5.4. Los microtúbulos cruciales durante la mitosis.....	19

1.5.5. Microtúbulos y comportamiento dinámico con antimetabólicos.....	21
1.6. ANTECEDENTES.....	22
1.6.1. Ensayos con CBSIs de productos naturales y análogos.....	23
1.6.2. Ensayos con CBSIs de estudios <i>in silico</i> y sintetizados.....	25
1.7. JUSTIFICACIÓN.....	30
1.8. HIPÓTESIS.....	30
1.9. OBJETIVOS.....	31
1.9.1. Objetivo general.....	31
1.9.2. Objetivos específicos.....	31
2. MATERIALES Y MÉTODOS	32
2.1. ENSAYOS BIOLÓGICOS.....	33
2.1.1. Evaluación de la actividad anticancerígena y citotóxica <i>in vitro</i> de los compuestos en estudio por la técnica de WST-1.....	33
2.1.2. Determinación de la actividad apoptótica mediante la actividad de caspasa-3.....	35
2.1.3. Análisis de expresión génica diferencial en la línea celular SiHa tratada con el compuesto G-898 y comparada con la colchicina.....	36
2.1.4. Manejo de Residuos.....	42
3. RESULTADOS	43
3.1. ENSAYOS BIOLÓGICOS.....	44
3.1.1. Evaluación de la actividad anticancerígena y citotóxica <i>in vitro</i> de los compuestos en estudio por la técnica de WST-1.....	44
3.1.1.1. Citotoxicidad de los compuestos de estudio.....	44
3.1.1.2. Actividad anticancerígena de los compuestos de estudio...	45
3.1.2. Determinación de la actividad apoptótica mediante la actividad de caspasa-3.....	48

3.1.3. Análisis de expresión génica diferencial en la línea celular SiHa tratada con el compuesto G-898 y comparada con la colchicina.....	49
4. DISCUSIÓN.....	57
4.1. Evaluación de la actividad anticancerígena y citotóxica <i>in vitro</i> de los compuestos en estudio por la técnica de WST-1.....	58
4.2. Determinación de la actividad apoptótica mediante la actividad de caspasa- 3.....	62
4.3. Análisis de expresión génica diferencial en la línea celular SiHa tratada con el compuesto G-898 y comparada con la colchicina.....	63
5. CONCLUSIONES.....	67
6. PERSPECTIVAS	69
7. DIFUSIÓN	71
REFERENCIAS.....	73
ANEXO A	81

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Oncogenes	4
2. Carcinógenos químicos que forman aductos con el ADN	9
3. Agentes infecciosos relacionados en el desarrollo del cáncer	9
4. Fármacos de tipo inhibidores de cinasas	13
5. Anticuerpos monoclonales empleados en la terapia anticancerígena	13
6. Propiedades fisicoquímicas de las moléculas de los compuestos en estudio...	29
7. Citotoxicidad de los compuestos en la línea celular Chang.....	44
8. Actividad anticancerígena de los compuestos en la línea celular SiHa	46
9. Actividad anticancerígena de los compuestos en la línea celular MCF-7	47
10. Valores de fluorescencia emitidos de la rodamina liberada por la actividad de la caspasa-3	48
11. Vías biológicas reprimidas a causa del tratamiento con el compuesto G-898	51
12. Vías biológicas de interés y genes reprimidos de cada vía con el tratamiento G- 898.....	51

13. Vías biológicas sobreexpresadas a causa del tratamiento con el compuesto G-898.....	52
14. Vías biológicas de interés y genes sobreexpresados de cada vía con el tratamiento G-898	53
15. Vías biológicas reprimidas a causa del tratamiento con colchicina.....	54
16. Vías biológicas de interés y genes reprimidos de cada vía con el tratamiento de colchicina	55
17. Vías biológicas sobreexpresadas a causa del tratamiento con colchicina.....	55
18. Vías biológicas de interés y genes sobreexpresados de cada vía con el tratamiento de colchicina	56

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Página
1. Ensamble de los microtúbulos	15
2. Polimerización por inestabilidad dinámica de los microtúbulos	17
3. Comportamiento <i>treadmilling</i> de los microtúbulos	17
4. Cambios de los microtúbulos durante el ciclo celular	20
5. Imagen del microtúbulo y sus sitios de unión con algunos agentes antimitóticos	21
6. Formación de los microtúbulos y sitios de unión	23
7. Compuestos de distintos autores considerados como CBSIs	27
8. Moléculas obtenidas por screening virtual, presentando afinidad por el sitio de unión a la colchicina	29
9. Citotoxicidad de los compuestos de estudio en las células Chang	45
10. Actividad anticancerígena de los compuestos en las células SiHa.....	46
11. Actividad anticancerígena de los compuestos en las células MCF-7	47
12. Valores de la actividad de la caspasa-3, inducida por el tratamiento	49
13. Gel de agarosa al 1% de los RNA's obtenidos de la extracción.....	50

NOMENCLATURA

μL	Microlitro
aacDNA	Aminoalil cDNA
ABL	Protooncogen ABL, no receptor de tirosina cinasa
ABL2	Proteína tirosina cinasa no receptora 2
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
ATM	Ataxia telangiectasia-mutada
ATP	Adenosina trifosfato
ATR	Ataxia telangiectasia y Rad3
BCL-2	Regulador de apoptosis
BER	Reparación por escisión de base
BSA	Albumina de suero bovino
Buffer PE	Buffer de lavado
CA-4	Combretastatina A-4
CA-4P	Combretastatina-4 fosforilada

CBSIs	Agentes inhibidores al sitio de unión de la colchicina
Cdk1	Cinasa dependiente de ciclina 1
CIN	Inestabilidad cromosomal
CO₂	Dióxido de carbono
CXCR2	Receptor de quimiocina tipo 2
CXCR4	Receptor de quimiocina tipo 4
CXCR7	Receptor de quimiocina tipo 7
DAVID	The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
DSB	Rompimiento de la doble cadena
DTT	Ditiotreitol
EBs	Proteínas de unión final
EBV	Virus Epstein-Barr
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
ErbB	Receptor del factor de crecimiento epidérmico

FAK	Cinasa de adhesión focal
FDA	Agencia de Alimentos y Medicamentos
GIP	Polipeptido inhibitorio gástrico
GTP	Guanosín trifosfato
GWAS	Estudio asociado a nivel genómico
HBV	Virus de Hepatitis B
HCV	Virus de Hepatitis C
HEPES	4-(2-hidroxietil)-1-ácido piperazineetanosulfónico
HR	Recombinación homóloga
HTLV-1	Virus Linfotrópico Humano T1
IC₅₀	Concentración inhibitoria 50
M	Molaridad
MAP	Proteínas asociadas a microtúbulos
MAPK	Proteína quinasa activada a mitógeno
MCAK	Centrómero mitótico asociado a cinesina
MDR	Resistencia a multifármacos
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mM	Milimolar

MMR	Reparación de errores
MSI	Inestabilidad microsatélite
MTAs	Agentes de unión a microtúbulos
MTT	Bromuro de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol
MYC	Protooncogen MYC, factor de transcripción bHLH
N	Normalidad
NER	Reparación por escisión de nucleótido
NEU/HER2	Neuraminidasa/Receptor de tirosina cinasa 2
NHEJ	Unión final no homóloga
nm	Nanómetros
nM	Nanomolar
NRPTKs	Proteínas no receptoras de tirosina/cinasa
PBS	Buffer fosfato salino
pmol	Pico mol
RAS	Protooncogen RAS, GTPasa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscripción

RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
SAC	Puntos de control del ensamble del huso mitótico
SDS	Dodecilsulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
SRB	Sulforodamida B
SSB	Rompimiento de una cadena
SSC	Buffer salino de citrato sodio
TBA s	Agentes de union a tubulina
TRK	Receptor de tirosina cinasa
UV	Radiación ultravioleta
V	Voltios
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VPH	Virus del papiloma humano
WST-1	4-[3-(4-yodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-disulfonato de benceno

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. EL CÁNCER

El cáncer es una enfermedad muy compleja que involucra la acumulación de múltiples cambios genéticos o mutaciones, provocando el crecimiento incontrolado de las células, la cual es su característica principal [1].

En las células normales, la división y la replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN) están particularmente susceptibles a daños y lesiones, pero están estrechamente vigilados por puntos de control del ciclo celular. Mientras que efectos más deletéreos ejecutan mecanismos a prueba de fallos, tales como apoptosis, necrosis, autofagia y senescencia celular. En consecuencia, al daño sobre el ADN (mutaciones), las células cancerígenas adoptan capacidades que les permiten eludir la maquinaria de vigilancia [2].

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo; en el año 2012 se presentaron 14 millones de nuevos casos y en el año 2015 se atribuyeron 8.8 millones de muertes relacionadas con el cáncer [3]. Se prevé que el número de nuevos casos aumente en aproximadamente un 70% en los próximos 20 años. Los cánceres diagnosticados con más frecuencia en el hombre son los de pulmón, próstata, colon y recto, estómago e hígado. En la mujer los más frecuentes son los de mama, colon y recto, pulmón, cuello uterino y estómago. En México en el año 2014, el total de defunciones a causa de un tumor maligno fue de 71 900 [4].

1.2. GENÉTICA DEL CÁNCER

El cáncer es caracterizado por el aberrante descontrol de la proliferación de células. Se describen algunas alteraciones funcionales durante el desarrollo del cáncer; señales de

autosuficiencia con relación al crecimiento, insensibilidad a señales anti crecimiento, un potencial ilimitado de la replicación, evasión de la respuesta inmunológica, estrés oxidativo y la presencia de la inestabilidad genómica [5, 6]. Muchos factores reguladores activan o desactivan los genes que dirigen la proliferación y diferenciación celular.

Los oncogenes codifican proteínas que promueven la pérdida del control de crecimiento y la conversión de una célula a un estado maligno (tabla 1). Los genes supresores de tumores actúan como frenos celulares, codifican proteínas que restringen el crecimiento celular y previenen la transformación maligna de las células [7].

Las alteraciones de los oncogenes y genes supresores de tumores son responsables de la tumorigénesis. Los oncogenes se encuentran mutados, provocando que el gen se active. Dichas activaciones oncogénicas pueden resultar de translocaciones cromosómicas, amplificaciones génicas o mutaciones. Los genes supresores de tumores presentan un sentido opuesto a las alteraciones genéticas. Las mutaciones de estos genes reducen la actividad del producto génico. Las inactivaciones surgen de las mutaciones, las cuales pueden ser que pierdan ciertos residuos y por ende dan como resultado una proteína truncada, también pueden llegar a presentar inserciones de diversos tamaños o silenciamiento epigenético. Los oncogenes y los genes supresores de tumores ambos conducen el aumento del número de células tumorales, lo promueven mediante la estimulación del crecimiento, por inhibición de la muerte celular o por no lograr controlar adecuadamente el ciclo celular [8].

Tabla 1. Oncogenes.

Oncogen	Tipo de cáncer
MYC	Linfoma, leucemia
	Sarcoma osteogénico
	Adenocarcinoma de mama
	Papiloma de la piel
	Adenocarcinoma de células de islote
RAS	Melanoma
ABL	Adenocarcinoma de pulmón
BCL-2	Linfoma
NEU/HER2	Linfoma de células B
TRK GIP	Adenocarcinoma de mama, ovario y estómago
	Carcinoma de tiroides
	Carcinoma de ovario y glándula suprarrenal

La epigenética se considera el estudio de cambios en función de los genes que son mitóticamente o meióticamente heredables y no involucra cambios en la secuencia de ADN. La forma en cómo la estructura de la cromatina es preservada y ordenada es importante para la comprensión del origen de las alteraciones epigenéticas. Dichos cambios epigenéticos modifican la expresión de genes involucrados en el desarrollo de muchos tipos de cáncer. La mayoría de las alteraciones están asociadas con la variación en la metilación de ADN o en la modificación de las proteínas (histonas) que forman el nucleosoma, unidad fundamental de la cromatina. Por otra parte, las pequeñas moléculas de ARN no codificantes llamadas microRNAs (miRNAs) también se encargan de regular la expresión de genes, al existir aberraciones en la expresión de dichos miRNA's modifican la expresión de genes implicados en el desarrollo del cáncer [9].

La inestabilidad genómica es una característica de la mayoría de los cánceres humanos. Existen diversas formas de inestabilidad; la inestabilidad cromosomal (CIN) que se refiere

a la alta velocidad en que la estructura cambia en comparación con las células normales; la inestabilidad microsatélite (MSI) que se caracteriza por la expansión o contracción de la cantidad de oligonucleótidos repetidos presentes en secuencias microsatélites y las formas de inestabilidad que son caracterizadas por incremento de la frecuencia de mutaciones en los pares de bases [6].

Lo mencionado anteriormente tiene implicación en la progresión y desarrollo de diversos tipos de cáncer, a consecuencia de esos cambios las células tumorales evolucionan, lo que les permite escapar de la homeostasis. Algunos de los mecanismos que presentan las células cancerígenas son: la evasión de la apoptosis, angiogénesis, invasión de tejidos, resistencia a la terapia y el acortamiento de telómeros [10]. A continuación, se describen brevemente los mecanismos mencionados.

- El proceso de metástasis es considerado como la migración y la proliferación de las células tumorales desde el tumor primario a sitios distantes [11]. Dichas células se pueden mover tanto al azar y direccionalmente, la invasión, migración y la difusión son más eficientes cuando la célula está implicada en la migración dirigida. Se han observado diferentes tipos de migración celular como quimiotaxis (agentes solubles), haptotaxis (en respuesta a un estado, señal extracelular sólido), electrotaxis (cambios en campos eléctricos) y durotaxis (señales mecánicas dentro del microambiente) [12].
- La angiogénesis es el proceso por el cual las células endoteliales microvasculares proliferan. Dicho proceso no sólo facilita el crecimiento del tumor mediante el suministro de nutrientes y oxígeno, también es un requisito para la diseminación de las células tumorales. Las células tumorales producen quimiocinas que actúan

directamente sobre las células endoteliales, dichas células expresan los receptores de quimiocinas tipo 2, 4 y 7 (CXCR2, CXCR4, CXCR7 por sus siglas en inglés) y múltiples ligandos. Los receptores de quimiocinas pueden actuar de manera sinérgica con el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) para la generación de nuevos vasos sanguíneos [12].

- Resistencia a la terapia: inicialmente muchos tumores aparentemente responden al tratamiento, pero no todas las células neoplásicas mueren, la población residual permite regenerar el tumor, el cual ya no es sensible a los medicamentos administrados. Dicha resistencia implica diversos mecanismos, que con frecuencia ocurren juntos, complicando los intentos de combatirlos. Entre los principales mecanismos de evasión se encuentran: alteración de dianas de fármacos, expresión de las bombas de flujo, expresión de mecanismos de desintoxicación, reducción de la susceptibilidad a la apoptosis y necrosis, e incrementando la habilidad para dañar el ADN y alteración de la proliferación celular [13].
- Telómeros: dichas estructuras tienen un papel esencial en asegurar que el final de los cromosomas no sean sitios de error o daño, el acortamiento de estos muestra dos efectos opuestos durante el desarrollo del cáncer. Por un lado, puede llevar a cabo un efecto supresor de tumores a través de la detención de la proliferación inducida por la activación de cinasas ATM y ATR. Mientras que la pérdida de la protección de los telómeros puede conducir a una crisis telomérica, el cual es un estado de inestabilidad genómica que promueve la progresión del cáncer. En los seres humanos existen factores que permiten que los telómeros actúen como reloj mitótico de envejecimiento replicativo. Así mismo, la enzima que sintetiza el ADN

telomérico esencial para la estabilidad del ADN solo se expresa en etapas tempranas del desarrollo. Se ha observado la expresión de la telomerasa en una gran cantidad de tumores [14].

1.3. CAUSAS DE CÁNCER

El panorama mutacional del cáncer es generado a través de la combinación de alteraciones del ADN, debido a ataques constantes por fuentes endógenas durante el metabolismo y a las interacciones con mutágenos exógenos, los cuales pueden llegar a causar sustituciones de bases, inserciones, deleciones, reordenamiento cromosómico, entre otros [15].

Los mutágenos son agentes que dañan el ADN de manera que van a promover cambios en la secuencia de dicho ADN. Algunos de los mutágenos endógenos son las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), se forman cuando las células se encuentran en condiciones fisiológicas normales, algunas moléculas orgánicas son capaces de generarlas cuando reaccionan con oxígeno molecular o cuando las células se exponen a radiaciones ionizantes [16].

Algunos de los procesos endógenos pueden inducir daño al ADN, durante las diferentes etapas del ciclo celular, por ello es importante mantener la integridad del ADN, lo cual es vital para la viabilidad celular y salud de los organismos. Como se ha mencionado el genoma está bajo constantes ataques de subproductos metabólicos, procesos de hidrólisis y diversos defectos que provocan la ruptura del ADN. Existen varias proteínas que están involucradas en reconocer las modificaciones y reparar el daño [17, 18, 19].

Durante la fase G1 del ciclo celular se presenta el rompimiento de la doble cadena o de una sola cadena (DSB y SSB respectivamente, por sus siglas en inglés), por lo general el daño se debe a elementos transponibles, ROS o algunas enzimas, estas lesiones son reparadas a través de la unión final no homóloga (NHEJ por sus siglas en inglés), por la vía de reparación por escisión de base (BER por sus siglas en inglés) y por reparación de escisión de nucleótido (NER por sus siglas en inglés) [19, 18].

En la fase S por lo regular ocurre una mala incorporación de nucleótidos, acumulación de cortes, secuencias repetidas, roturas en la horquilla y horquillas invertidas, también ocurren errores de base, pequeñas inserciones y deleciones. Este tipo de eventos son reparados a través de las vías de reparación de errores (MMR por sus siglas en inglés), BER, recombinación homóloga (HR por sus siglas en inglés). En el caso de la fase G2 y M, en caso de ocurrir DSB o alguna hendidura en la cadena, el tipo de reparación sería por HR [19].

Los organismos están expuestos a agentes del medio (múgatenos exógenos) que dañan el ADN. Los múgatenos exógenos se pueden clasificar en químicos, físicos y biológicos.

La exposición a cancerígenos químicos (tabla 2), pueden provocar daño al ADN y dar lugar a mutaciones. El daño se presenta por la unión covalente del cancerígeno con el ADN, formando un aducto, existen otras modificaciones tales como daño oxidativo e intercalación entre las bases nitrogenadas [16].

Tabla 2. Carcinógenos químicos que forman aductos con el ADN.

Compuesto	Fuente	Tipo de cáncer
Aflatoxina B ₁	Comida contaminada	Hígado
Benzo[a]pirano	Humo de cigarro	Pulmón, estómago y piel
cadmio	Cerámicos, baterías	Pulmón, Próstata y riñón
níquel	Aleaciones, electrodos	Pulmón
asbestos	Aislamientos térmicos	Pulmón
cloruro de vinilo	Plásticos y co-polimeros	Hígado y angiosarcoma

Se considera que el 40% del cáncer a nivel mundial es causado por exposiciones ambientales, tales como: carcinógenos, radiación ultravioleta (UV), radiación ionizante, virus, alcohol y obesidad [20, 21].

Estudios epidemiológicos de agentes infecciosos, incluyendo virus, bacterias o parásitos tienen cierta relación etiológica con algunos tipos de cánceres (tabla 3). Estos agentes han sido divididos en dos categorías. Los carcinógenos directos, los cuales expresan oncogenes virales que contribuyen directamente a la transformación de células cancerosas y los carcinógenos indirectos que causan cáncer a través de infecciones crónicas e inflamación [22].

Tabla 3. Agentes infecciosos relacionados en el desarrollo del cáncer.

Virus	Tipo de cáncer	Categoría
Virus Epstein-Barr (EBV)	carcinoma nasofaríngeo	Directo
Virus de Hepatitis B (HBV)	carcinoma hepatocelular,	Directo
Virus Linfotrópico Humano T1 (HTLV-1)	leucemias de células T	Directo
Virus del Papiloma Humano (VPH) subtipo 16 y 18	cáncer cervical	Directo
Virus de Hepatitis C (HCV)	carcinoma hepatocelular y algunos linfomas	Directo
<i>Helicobacter pylori</i>	cáncer gástrico	Indirecto

Además de los factores antes mencionados, debe considerarse la herencia genética. Un estudio asociado a nivel genómico (GWASs por sus siglas en inglés) de las variantes genéticas hace referencia a que el cáncer en una proporción representa a la causalidad y la otra a la estimada heredabilidad. La heredabilidad del cáncer es considerada como una contribución a causas genéticas, incluyendo a las mutaciones en la línea germinal. Una epimutación constitucional, término asignado por Holliday y cols. (1987), se describe como un cambio hereditario meióticamente o mitóticamente en la actividad genética, la cual es debida a una modificación epigenética del ADN y no a mutaciones de secuencias [23]. Estas anomalías epigenéticas se originan de la línea germinal de los padres o en la fase temprana del embrión. Dependiendo de la naturaleza de la modificación epigenética, la epimutación puede resultar en el silenciamiento o la activación de un gen [24].

1.4. TERAPIA ANTINEOPLÁSICA

El tratamiento para el cáncer es diverso, desde la monoterapia hasta la combinación de terapias dependiendo del tipo de cáncer, su propagación, y del estado de salud de cada paciente. La primera opción para algunos tipos de tumores sólidos es la cirugía. Se dice que la presencia o ausencia de células tumorales resistentes en el área que rodea la resección se considera generalmente como uno de los predictores más fuertes de la recurrencia y supervivencia del tumor [25].

La quimioterapia es una de las principales modalidades de tratamiento para el cáncer y casi siempre se usa como tratamiento sistémico. Muchos fármacos quimioterapéuticos inducen daño al ADN ya sea directa o indirectamente. Algunos fármacos inducen la detención del ciclo celular o bloquean vías de señalización [26].

La clasificación de los quimioterapéuticos se basa principalmente en su mecanismo de acción.

- Agentes alquilantes. La muerte celular se debe a la transferencia de un grupo alquilo al ADN, causando inhibición de la replicación y transcripción.
- Antimetabolitos. La forma estructural de estos agentes es muy similar a los componentes naturales, incluyendo nucleótidos y pueden incorporarse dentro del ADN o ácido ribonucleico (ARN), causando inhibición de la proliferación celular.
- Derivados de platino. Se activan de manera intracelular por la pérdida de un grupo cloruro y subsecuentemente estos quimioterapéuticos se unen de manera covalente al ADN, formando aductos, provocando la activación de varias vías de transducción de señales (detención del ciclo celular, muerte celular programada y apoptosis).
- Inhibidores de la topoisomerasa. Previenen la re-ligación de rupturas de la doble hebra de ADN que es inducido por enzimas mediante la estabilización de la formación de complejos entre proteína y sustrato de ADN [27].
- Antibióticos. Son agentes que se derivan de microorganismos, estos afectan la replicación del ADN por diversos mecanismos.
- Antimitóticos. Es la clase de fármacos que altera la dinámica de los microtúbulos, se lleva a cabo la formación del huso mitótico de manera anormal, ocurre una desalineación cromosómica y se activa de manera continua los puntos de control del ensamble del huso mitótico (SAC por sus siglas en inglés) [28].
- Inhibidores de cinasas. Las cinasas son una nueva clase de diana terapéutica para el tratamiento del cáncer, debido a que están relacionados con el proceso de

proliferación celular, inhibiendo algunos de los puntos de control de la mitosis, algunas proteínas o receptores de tipo tirosina/cinasa (tabla 4) [28, 29].

- Inhibidores de acetilasa de histona. Varios de estos fármacos se encuentran en estudios clínicos. Este tipo de antineoplásicos participan en la represión de la transcripción génica, a través de la compactación de la cromatina que a su vez elimina los grupos acetilo [30].
- Inmunoterapia. Se centra en el desarrollo de agentes que puedan activar el sistema inmunológico para reconocer y destruir las células tumorales (tabla 5). Engloba diversas estrategias que van desde activación del efector inmune innato y adaptativo, mecanismos inhibitorios y supresores. En esta se incluye la vacunación con antígenos tumorales, tratamiento con citocinas o interferones y el uso de anticuerpos [31].
- La terapia hormonal. Forma parte de una de las opciones de tratamiento para el cáncer; está dirigida contra la estimulación de receptores de crecimiento y estrógenos, con el fin de bloquear la función de las células [32].

Tabla 4. Fármacos de tipo inhibidores de cinasas.

Fármaco	Efecto inhibitorio	Fase de estudio
UCN-01, CEP-3891, CHIR-124	Detiene el ciclo celular, inhibe cdk1 y apoptosis	I-II
Flavopiridol, berberine, terameprocol	Detiene el ciclo celular e interrupción de la progresión mitótica	I-II
Hesperadin, ZM447439, AT-9283	Reordenamiento cromosomal, segregación, detención de la progresión mitótica, defectos en la citocinesis	I-II
Desatinib	Actividades promotoras del crecimiento de las proteínas de tirosina/cinasa	IV
Lapatinib	Bloquea de forma reversible la fosforilación del receptor del factor de crecimiento epidérmico	II

La radioterapia es otro tratamiento empleado, avances recientes con dicho tratamiento permiten el uso de rayos X produciendo la ionización de átomos, originando diferentes tipos de partículas, tales como protones e iones pesados para el tratamiento de tumores con una fuente estándar de fotones [33]. El objetivo de la radioterapia curativa es eliminar todas las células madre cancerosas en un tumor primario y en los ganglios linfáticos regionales, y al mismo tiempo limitando el daño a tejido normal [34].

Tabla 5. Anticuerpos monoclonales empleados en la terapia anticancerígena.

Anticuerpo	Tipo de cáncer
Trastuzumab	Cáncer de mama
Bevacizumab	Cáncer de colon
Alemtuzumab	Leucemia linfocítica
Gemtuzumab	Leucemia mieloide aguda

1.5. MICROTÚBULOS COMO BLANCOS TERAPÉUTICOS EN EL CÁNCER

A pesar del creciente número de terapias que van dirigidas a vías específicas de cáncer, los tratamientos citotóxicos continúan siendo importantes en el área clínica. La razón fundamental para estos agentes es debido a atacan principalmente a las células tumorales, las cuales albergan una mayor división activa comparada con las células de tejidos normales.

Un componente importante de las células eucariotas es el citoesqueleto, el cual está formado de filamentos intermedios, microfilamentos y microtúbulos. Los microtúbulos están implicados en una amplia gama de procesos celulares, incluyendo el mantenimiento de la morfogénesis de la célula, transporte celular, conducen la separación de cromosomas durante la división celular, forman parte del huso mitótico, regulan la polaridad celular, forman la base de cilios y flagelos. Es por ello que los microtúbulos son reconocidos como atractivos blancos terapéuticos para la quimioterapia del cáncer [35, 36, 37]. Los antimitóticos son agentes citotóxicos usados en la terapia contra el cáncer, estos afectan la dinámica de los microtúbulos, y estos siguen siendo una diana importante en el desarrollo de nuevos agentes antineoplásicos, ya que no todos los sitios en la tubulina han sido explotados [38].

1.5.1. Ensamble y composición de microtúbulos.

Los microtúbulos se forman a partir de la polimerización de proteínas ensambladas por heterodímeros de α y β tubulina, que está regulado por la hidrólisis de guanosín trifosfato (GTP) que se encuentra unido a β -tubulina. Los microtúbulos tienen un diámetro de 25 nm y una pared con grosor aproximado de 4 nm. La pared de un microtúbulo está formada

por protofilamentos que se ubican en hileras longitudinales, las cuales se alinean en paralelo con respecto al eje longitudinal del túbulo. Cada microtúbulo está conformado por 13 protofilamentos (figura 1) [7].

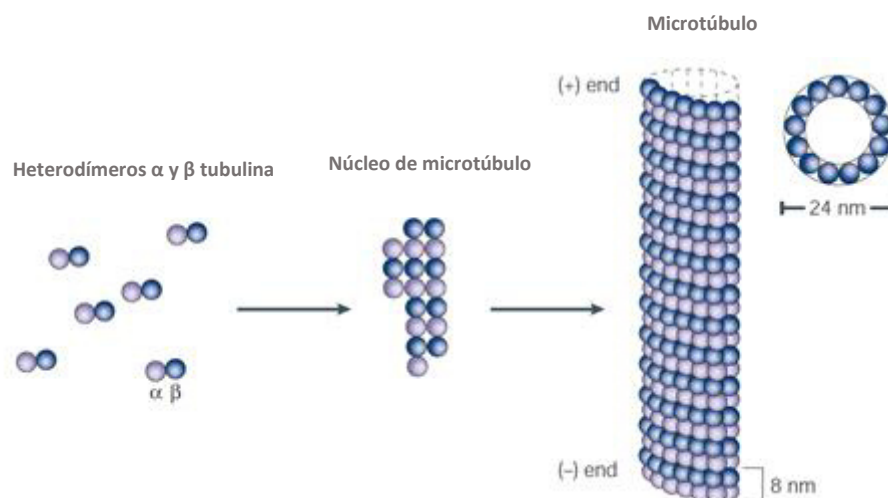


Figura 1. Ensamble de los microtúbulos [39].

1.5.2. Dinámica de los microtúbulos.

Los microtúbulos contienen dos extremos estructuralmente distintos: uno se conoce como extremo positivo (β -tubulina) de rápido crecimiento y un extremo contrario llamado negativo (α -tubulina) de crecimiento lento. La polimerización de microtúbulos ocurre por un mecanismo de nucleación-elongación, en la cual la formación relativamente lenta de un corto microtúbulo “núcleo”, es seguido por una rápida elongación de los microtúbulos en sus extremos por la adición reversible de dímeros de tubulina. Los correctos movimientos de los cromosomas y su propia segregación a células hijas requiere una dinámica extremadamente rápida, provocando que la mitosis sea sensible a fármacos dirigidos a los microtúbulos [36, 40].

Las funciones biológicas de los microtúbulos en todas las células están determinadas y reguladas en gran parte por su polimerización dinámica. Existen dos tipos de comportamientos dinámicos, ambos con sistemas de purificación de microtúbulos *in vitro* y en células.

- 1) Inestabilidad dinámica. Es un proceso en el cual los microtúbulos individuales y la parte de sus extremos cambian entre fases de crecimiento y acortamiento. Ambos extremos de los microtúbulos no son equivalentes, el extremo positivo crece y se acorta más rápidamente que el extremo negativo. Los microtúbulos experimentan periodos relativamente largos de alargamiento lento y breves periodos de acortamiento rápido y en algunos otros periodos la dinámica es atenuada. Dicho comportamiento se caracteriza por cuatro variables principales: la tasa de crecimiento de microtúbulos, la tasa de acortamiento, la frecuencia de transición del estado de crecimiento o pausa al acortamiento “catástrofe” y la frecuencia de transición de acortamiento o pausa al crecimiento “rescate” (figura 2) [36].

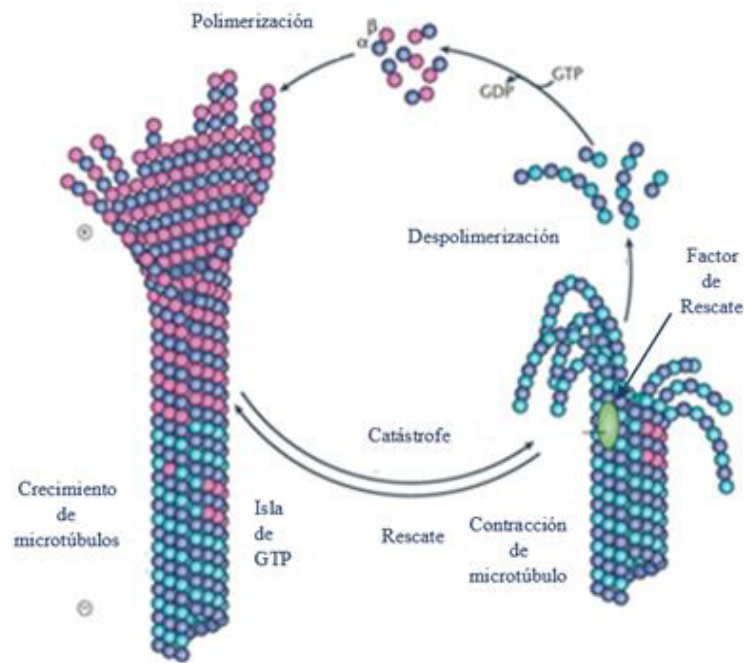


Figura 2. Polimerización por inestabilidad dinámica de los microtúbulos [36].

2) *Treadmilling*. Es el crecimiento neto en un extremo de microtúbulos y el acortamiento neto equilibrado en el extremo opuesto (figura 3). Implica el flujo intrínseco de las subunidades de la tubulina desde el extremo positivo hasta el extremo negativo del microtúbulo. Dicho comportamiento ocurre tanto *in vivo* como *in vitro* y puede ser importante en la mitosis [36].

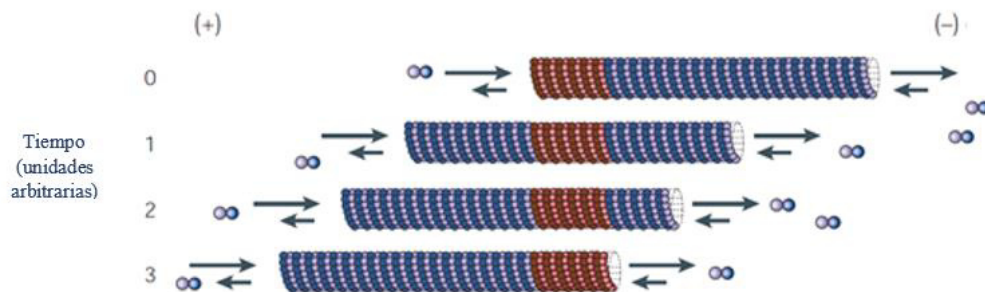


Figura 3. Comportamiento *treadmilling* de los microtúbulos [39].

Los mecanismos que controlan el grado en que una población de microtúbulos muestre uno u otro comportamiento, pueden implicar el grado de modificación postraducciona de la tubulina y especialmente las acciones de las proteínas reguladoras asociadas a microtúbulos (MAP por sus siglas en inglés).

1.5.3. Proteínas reguladoras de microtúbulos

La inestabilidad dinámica de los microtúbulos y las conexiones entre los microtúbulos y las estructuras celulares son controladas espacial y temporalmente por numerosos factores, que se agrupan en MAP y proteínas motoras. Entre ellas las proteínas de microtúbulos *plus-end-tracking* (+TIPs) que incluyen diversos reguladores de microtúbulos estructural y funcionalmente, estas se distinguen por su capacidad para concentrarse en el crecimiento de los extremos de microtúbulos [40].

Dos clases de proteínas motoras se unen a los microtúbulos e hidrolizan la adenosina trifosfato (ATP) para moverse constantemente a lo largo, estas son dineínas y kinesinas. Las dineínas se mueven a lo largo de los microtúbulos (extremo negativo) a las vesículas de tráfico y localizan a los organelos, y las kinesinas se mueven en dirección contraria (extremo positivo) participando en la formación del huso mitótico y la separación cromosómica durante la mitosis [40].

La dinámica de microtúbulos cambia durante el ciclo celular y durante la diferenciación celular, debido a factores que promueven el crecimiento o desmontaje de estos. Las polimerasas de microtúbulos, como los miembros de la familia XMAP215 de +TIPs, se unen al extremo positivo de los microtúbulos, para reclutar los dímeros de tubulina. La actividad de estas proteínas ayuda a explicar por qué los microtúbulos se unen

en las células mucho más rápido que cuando se presenta de manera *in vitro*. Otras TIPS, como las proteínas de unión final (EBs por sus siglas en inglés) pueden aumentar ligeramente las tasas de polimerización de microtúbulos *in vitro*, posiblemente modulando los extremos de los microtúbulos [40].

La despolimerización de los microtúbulos está regulada por las depolimerasas de microtúbulos que pertenecen a las familias de kinesinas 13, 8 o 14. Los miembros de la familia de kinesinas 13, tales como el centrómero mitótico asociado a kinesina (MCAK), éstos utilizan la energía de hidrólisis de ATP para eliminar las subunidades terminales de los extremos de los microtúbulos. Los miembros de la familia kinesina 8 pueden caminar al extremo positivo, donde al parecer desestabilizan GTP mediante la eliminación de subunidades de tubulina [36].

1.5.4. Los microtúbulos cruciales durante la mitosis.

La dinámica de los microtúbulos es una etapa vulnerable durante el ciclo celular, siendo lenta la rotación de los microtúbulos en las células interfásicas, la duración puede ser de minutos u horas dependiendo del tipo de célula. A inicios de la mitosis hay cambios dramáticos en la red de microtúbulos, el desmontaje de estos es seguido por la formación de una nueva red de los microtúbulos del huso que pueden cambiar entre 4 y 100 veces más rápidamente que los de interfase. La formación de los astros mitóticos y microtúbulos del cinetocoro requieren una dinámica estrictamente regulada para asegurar la correcta unión y segregación de los cromosomas durante la división celular (figura 4) [41].

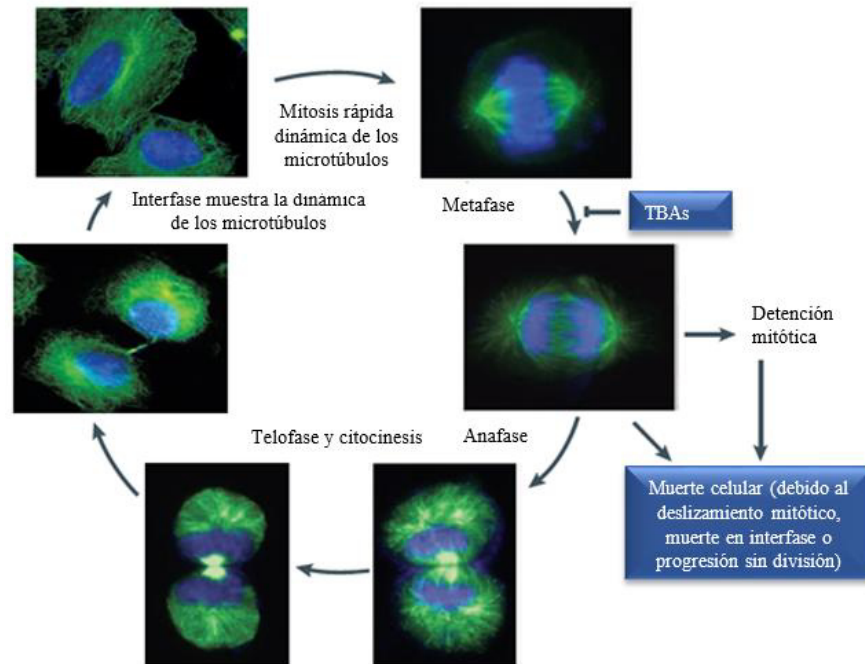


Figura 4. Cambios de los microtúbulos durante el ciclo celular [41].

La mitosis en la mayoría de las células progresa rápidamente y la dinámica de los microtúbulos en el huso es necesaria durante todas las etapas de la mitosis. Primeramente, se requiere la correcta fijación de los cinetocoros de los cromosomas al huso durante la prometáfase, después de la ruptura de la envoltura nuclear. Posteriormente los movimientos complejos de los cromosomas que los llevan a sus posiciones correctamente alineados en la placa metafásica llamada congresión, y finalmente la separación de los cromosomas en la etapa de anafase y telofase. La presencia de un solo cromosoma que sea incapaz de lograr una unión bipolar al huso es suficiente para evitar que una célula pase de la etapa de anafase, por lo tanto, la célula permanece bloqueada y posteriormente experimenta apoptosis [41].

1.5.5. Microtúbulos y comportamiento dinámico con antimitóticos.

Además de las proteínas asociadas a microtúbulos, existen moléculas de origen natural y sintético que interfieren con la dinámica de éstos. Diversos ligandos de unión a tubulina suprimen la dinámica de los microtúbulos en las células y como consecuencia bloquean la maquinaria de la mitosis en la célula, provocando la muerte. Por lo tanto, los agentes de unión a microtúbulos (MTAs por sus siglas en inglés) se han utilizado como herramienta para el estudio de la dinámica de los microtúbulos en diferentes procesos celulares. Algunos de los MTAs pertenecen a los más exitosos fármacos quimioterapéuticos. Se han descrito cinco sitios de unión a la tubulina de los microtúbulos para agentes exógenos, los cuales pueden dividirse en dos clases; los que estabilizan y los que desestabilizan a los microtúbulos (figura 5). Los estabilizadores son agentes que se unen al sitio de taxano, laulimalida y los agentes desestabilizadores se unen al sitio de alcaloides de la vinca, colchicina y el sitio más reciente maitansina [37].

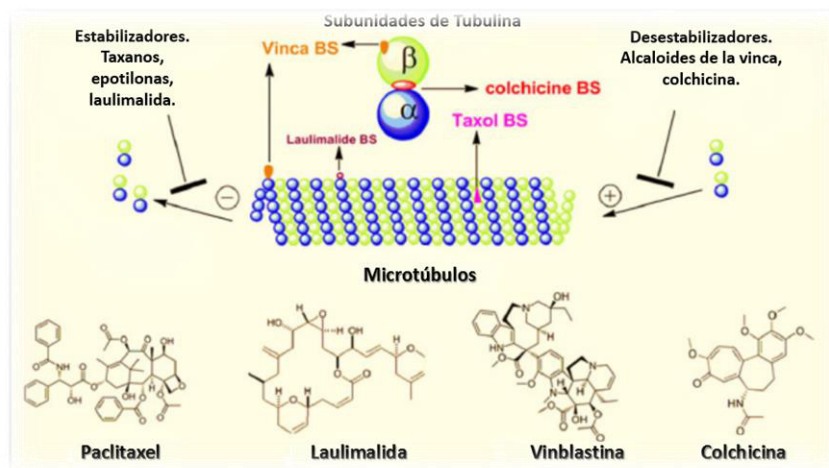


Figura 5. Imagen del microtúbulo y sus sitios de unión con algunos agentes antimitóticos [42].

Entre los diferentes tipos de agentes exógenos antimitóticos se encuentran los agentes inhibidores al sitio de unión de la colchicina (CBSIs por sus siglas en inglés) en la tubulina, se han estado investigando para el tratamiento de algún tipo de cáncer, aunque hasta el momento no se ha alcanzado la fase comercial de ninguno de estos compuestos que se encuentran en estudio.

1.6. ANTECEDENTES

Uno de los blancos quimioterapéuticos más exitosos son los microtúbulos, sin embargo, existen diversos sitios en la tubulina que no han sido ampliamente explorados. El sitio de unión de la colchicina es uno de los más importantes dominios de la β -tubulina para potencializar la despolimerización del polímero. Un número de moléculas consideradas como CBSIs en la tubulina se han diseñado y sintetizado, conteniendo una gran diversidad a nivel estructural [42].

La colchicina fue uno de los primeros agentes desestabilizadores de tubulina. Fue extraída del azafrán prado venenosa *Colchicum autumnale L.* el cual es un alcaloide que se ha usado en medicina por un largo tiempo. El dominio de unión de la colchicina se encuentra en el centro del dímero de tubulina. Se ubica en el lumen del filamento y no en el lugar de la superficie de interacción (figura 6). La colchicina inhibe de manera efectiva la mitosis [42].

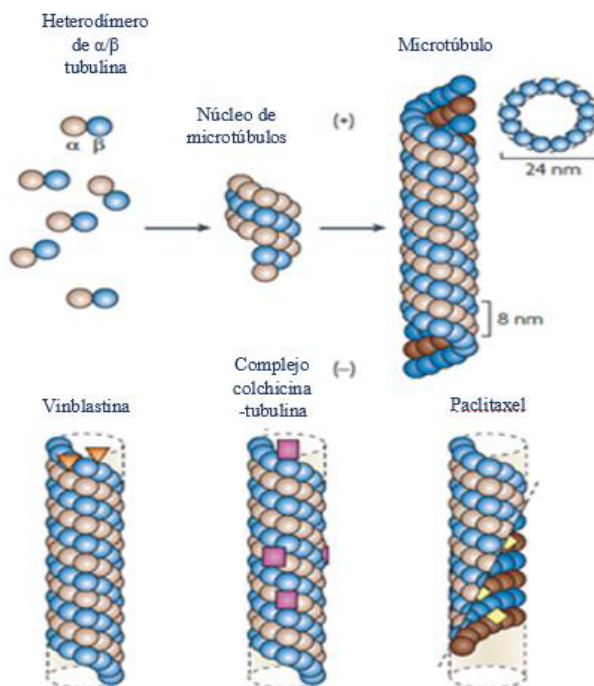


Figura 6. Formación de los microtúbulos y sitios de unión [43].

Ravelli y cols., (2004) identificó el sitio de unión a la colchicina en la tubulina mediante la inspección de mapas de diferencia de densidad electrónica [44]. Se determinó la estructura de un complejo ternario de tubulina de 4.2 Å. El sitio de colchicina está localizado en el dominio intermedio de la subunidad β. Hamel y cols., (2000) dieron el primer informe del enfoque basado en la estructura de los agentes de unión al sitio de la colchicina [45]. Gussio y cols., (2005) emplearon estudios de acoplamiento y simulaciones de la dinámica molecular para la construcción de modelos de unión para diversos CBSIs [42, 46].

1.6.1. Ensayos con CBSIs de productos naturales y análogos.

Algunos de los CBSIs están basados en productos naturales como los colchicinoides y combretastatinas. Las chalconas, los cuales son compuestos naturales de interés, debido a su amplia gama de actividades biológicas, son farmacológicamente activos y se ha

demostrado que actúan como agentes antimitóticos, antiproliferativos, antiinflamatorios y antivirales. Su actividad citotóxica está asociada con la inhibición de la tubulina y la capacidad de interferir con la formación de microtúbulos.

Ruan y cols., (2011) informaron una serie de inhibidores de la polimerización de la tubulina que contienen el esqueleto de resveratrol y un resto de chalcona. El compuesto C19 (figura 7) mostró la actividad inhibitoria más potente con una concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) = 0.2 $\mu\text{g/mL}$ en la línea celular HepG2, 1.4 $\mu\text{g/mL}$ en B16-F10 y 0.1 $\mu\text{g/mL}$ en A549. También mostró efecto inhibidor de la polimerización de tubulina *in vitro* en un 50 % (2.6 $\mu\text{g/mL}$) [47].

Las Combrestastatinas de origen natural son agentes antimitóticos aislados de la corteza del árbol de *Combretum caffrum* de Sudáfrica. Combrestatina A-4 y A-2 son los miembros más simples y más potentes de esta clase de compuestos. Actúan como agentes antineoplásicos por unión a tubulina, inhibiendo la progresión del ciclo celular en la mitosis [48]. Combretastatina A-4 (CA-4) actualmente se está evaluando en ensayos clínicos para el tratamiento de tumores sólidos. Varios estudios en fase II de Combretastatina-4 fosforilada (CA-4P) están en curso para diferentes tipos de cáncer, incluyendo el cáncer anaplásico de tiroides, de pulmón y de ovario como es reportado por Rustin y cols., (2010) [49].

El compuesto CC-5079 (figura 7) estudiado por Zhang y cols., (2006) es un análogo de CA-4, llamado isocombretastatina A, mostró actividad antiangiogénica y antitumoral; también detiene el ciclo celular en la fase G2/M, aumenta la fosforilación en G2/M e induce apoptosis. Dicha actividad biológica se llevó a cabo por medio de ensayos de incorporación de timidina [H^3], fueron tratadas varias líneas celulares de cáncer de colon,

próstata, mama, pulmón, ovario, útero y piel, obteniendo un rango de IC₅₀ entre 0.004 a 0.05 µM [50].

La Podofilotoxina y sus análogos son extraídos de raíces secas de *Podophyllum peltatum*, este compuesto compite con la colchicina por el sitio de unión en la β-tubulina. Dos derivados semisintéticos menos tóxicos que la podofilotoxina se han desarrollado; etopósido es un potente inhibidor de la topoisomerasa II pero inhibe débilmente a la tubulina y el tenipósido que es menos usado como quimioterapéutico [48].

1.6.2. Ensayos con CBSIs de estudios *in silico* y sintetizados.

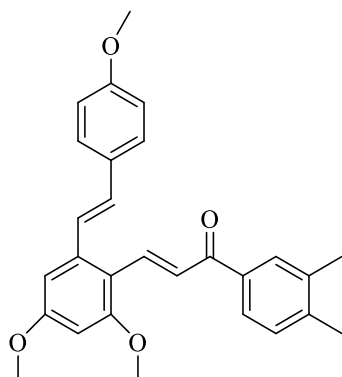
La metodología de diseños de fármacos asistidos por computadora se ha aplicado para el desarrollo de nuevos fármacos y han aportado herramientas útiles en el diseño y descubrimiento de anticancerígenos. En los últimos años se han realizado screening virtuales con el fin de identificar nuevos agentes antimitóticos.

Anne y cols., (2008) estudio la molécula IRC-083927 (figura 7) el cual es un derivado sintético del imidazol, muestra actividad antiproliferativa muy potente en diversas líneas de células tumorales humanas (MDA-MB-231, DU-145, NCI-H69, MIA Paca-2 y A549) y en aquellas que muestran resistencia al taxol, alcaloides de la vinca, produciendo sus efectos por la detención del ciclo celular en la fase G2/M. La inhibición se determinó con el ensayo colorimétrico WST-1. Todas las líneas celulares fueron sensibles con un rango de IC₅₀ 0.007-0.015 µM [51].

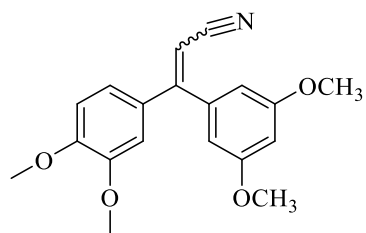
El compuesto UA62784 (figura 7) fue estudiado por Henderson y cols., (2009) para la evaluación de la actividad citotóxica utilizaron el ensayo de bromuro de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT); las líneas celulares fueron tratadas a diferentes concentraciones, obteniendo los siguientes IC₅₀ para MiaPaCa 0.043 ± 0.004 μM, Panc-1 0.085 ± 0.007 μM y BxPC3 0.103 ± 0.014 μM. Provocó la detención del ciclo celular en fase G2/M, indujo apoptosis y evitó la formación del huso bipolar [52].

La molécula JG-03-14 (figura 7) es un pirrol bromado tetra sustituido, Nava y cols., (2009) mencionaron que ha demostrado tener un amplio efecto citotóxico y anti proliferativo contra células cancerosas, obteniendo un IC₅₀ de 0.036-0.08 μM. El ensayo fue a través de Sulforodamina B (SRB) como control. Este compuesto provoca la detención del ciclo celular en fase G2/M [53].

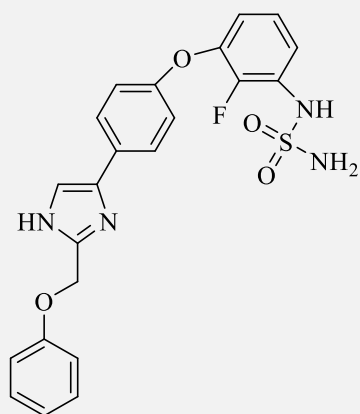
El compuesto MT119 (figura 7) tiene estructura planar, fue optimizado como un nuevo CBSIs a partir de una biblioteca virtual. Un estudio realizado por Zhang y cols., (2011) demostraron que dicho compuesto inhibe la polimerización de la tubulina significativamente en células tumorales e interrumpe el ciclo celular G2/M, inhibe la proliferación de diez líneas células tumorales ensayadas con SRB como control, obteniendo un rango de IC₅₀ entre 0.06-0.53 μM, también presenta citotoxicidad para células resistentes a vincristina [54].



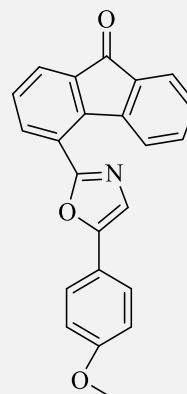
Compuesto C19



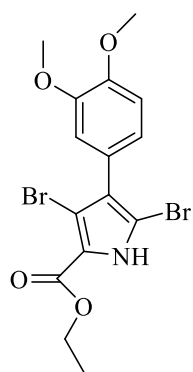
Compuesto CC-5079



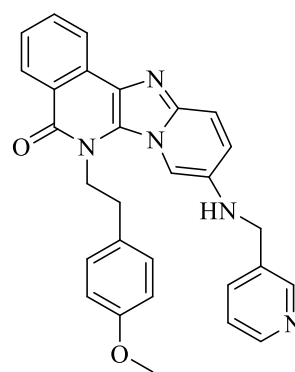
Compuesto IRC-083927



Compuesto UA62784



Compuesto JG-03-14



Compuesto MT119

Figura 7. Compuestos de distintos autores considerados como CBSIs.

En un estudio previo de nuestro grupo de trabajo se realizó un screening virtual, con el fin de identificar nuevos fármacos anticancerígenos. En dicho estudio se analizaron 13, 195,609 moléculas a través de la librería química (ZINC) donde se aplicaron las reglas de Lipinski con la finalidad de tener las propiedades fisicoquímicas adecuadas; se obtuvieron 1, 750, 000 componentes, los cuales fueron estudiados a través del software Docking para determinar cuáles eran candidatas para los sitios de unión de la colchicina en la β -tubulina, al final del estudio solo 20 grupos de compuestos con valores altos de interacción fueron seleccionados [55].

Del estudio previo se seleccionaron tres compuestos con características adecuadas de afinidad, a los cuales, en el presente estudio evaluamos su actividad anticancerígena y citotoxicidad, la actividad apoptótica y el análisis de expresión génica (figura 8), dichos compuestos son los siguientes: (3E, 7E)-3,7-bis (2-oxo-1H-indol-3-iliden)-1,5-dihidropirrol[2,3-f]indol-2,6-diona nombre químico y G-311 nombre que nos referiremos en el transcurso del texto, 4-(1,3,4,5-tetrahidropirido[4,3-b]indol-2-carbonil)-1H-quinolin-2-ona (G-898) y 3-hidroxi-3-[3-(3-hidroxi-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-3-il)-2-oxociclohexil]-2,3-dihidro-1H-indol-2-one (G-309) estas moléculas fueron evaluadas y la molécula de referencia fue la colchicina. Algunas de las propiedades de las moléculas se representan en la tabla 6.

Tabla 6. Propiedades fisicoquímicas de las moléculas de los compuestos en estudio.

Molécula	Valor de docking (Kcal/mol)	Log p	Peso molecular (g/mol)
G-311	-11.6	3.81	446.422
G-898	-10.7	2.19	343.386
G-309	-10.6	1.16	392.14
Colchicina	-7.4	1.10	399.442

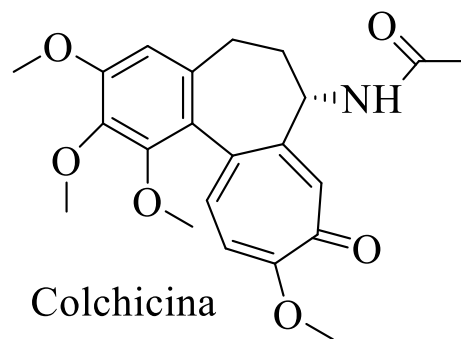
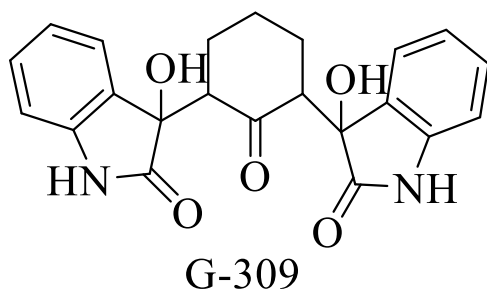
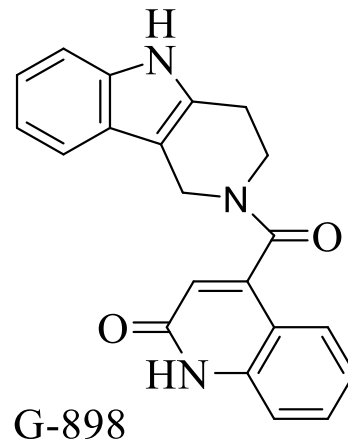
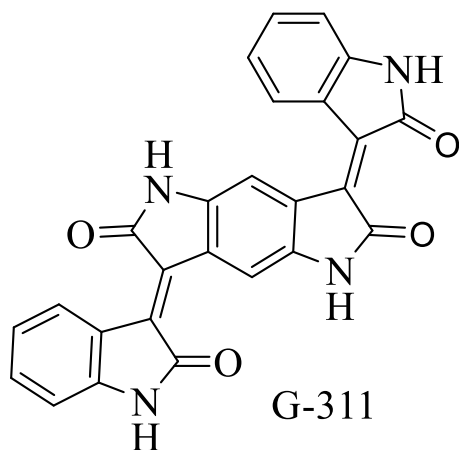


Figura 8. Moléculas obtenidas por screening virtual, presentando afinidad por el sitio de unión a la colchicina.

1.7. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolada de células. Es una de las principales causas de mortalidad y se prevé que aumentará en los próximos años, esto es debido en parte al crecimiento demográfico y al envejecimiento de la población.

Por otra parte, los tratamientos contra el cáncer suelen ser invasivos, dolorosos y ocasionan una gran variedad de efectos adversos. Es por ello que se buscan nuevas alternativas terapéuticas. La quimioterapia es uno de los tratamientos más utilizados para muchos tipos de cáncer, los medicamentos utilizados se usan solos o en combinación con otros fármacos u algún otro tratamiento.

Existen fármacos (antimitóticos) que se unen a la tubulina e impiden la polimerización de los microtúbulos, por lo tanto, la tubulina se ha considerado como un blanco terapéutico atractivo en la terapia del cáncer, por lo anterior es importante explorar nuevos compuestos afines a la tubulina específicamente en los sitios de unión de la colchicina que puedan tener potencial uso como antineoplásicos.

1.8. HIPÓTESIS

Los compuestos G-311, G-898 y G-309 exhiben un mejor potencial como agentes anticancerígenos que la colchicina.

1.9. OBJETIVOS

1.9.1. Objetivo General

Evaluar la actividad anticancerígena y citotóxica de los compuestos G-311, G-898 y G-309 sobre líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7), cáncer de cérvix (SiHa) y Chang.

1.9.2. Objetivos Específicos

- Determinar la actividad anticancerígena de los compuestos en estudio sobre líneas celulares cancerígenas por la técnica WST-1.
- Evaluar la actividad citotóxica sobre células Chang con la técnica WST-1.
- Determinar la actividad apoptótica de los compuestos sobre una línea celular mediante la actividad de la caspasa-3.
- Determinar la expresión génica diferencial del compuesto que presente mejor actividad anticancerígena y compararlo con la colchicina.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo los compuestos a evaluar fueron obtenidos de las siguientes compañías, el compuesto (3E, 7E)-3,7-bis (2-oxo-1H-indol-3-iliden)-1,5-dihidropirrol[2,3-f]indol-2,6-diona (G-311) se adquirió de MolMall (Suiza), el 4-(1,3,4,5-tetrahidropirido[4,3-b]indol-2-carbonil)-1H-quinolin-2-ona (G-898) de Mcule (California) y el 3-hidroxi-3-[3-(3-hidroxi-2-oxo-2,3-dihidro-1H-indol-3-il)-2-oxociclohexil]-2,3-dihidro-1H-indol-2-one (G-309) de MolPort (Letonia).

Se utilizaron las siguientes líneas celulares. Línea celular de cáncer de cérvix (SiHa) obtenida de The American Type Culture Collection (ATCC) con número de catálogo ATCC: HTB-35TM, línea celular de cáncer de mama (MCF-7) con número de catálogo ATCC: HTB-22TM y la línea celular de hígado (Chang) con número de catálogo ATCC-CCL-13TM.

El chip que se utilizó para el análisis de expresión génica fue H10KA de humano, adquirido en la Unidad de Microarreglos de DNA del Instituto de Fisiología Celular perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México.

Los reactivos utilizados se adquirieron de las siguientes compañías: CTR Scientific (Monterrey, N.L., México), SIGMA-ALDRICH (Saint Louis, MO, E.U.A.), Uniparts (Monterrey, N.L., México).

2.1. ENSAYOS BIOLÓGICOS

2.1.1. Evaluación de la actividad anticancerígena y citotóxica *in vitro* de los compuestos en estudio por la técnica de WST-1.

La actividad citotóxica se realizó con la línea celular de hígado de Chang y la actividad anticancerígena con las líneas celulares de cáncer de cérvix y mama.

Una vez que las células alcanzaron un 80% de confluencia, se procedió a realizarles dos lavados con buffer de fosfato (PBS), posteriormente se agregó 500 μL de tripsina 0.25% por cada frasco de medio de cultivo, se colocaron en la incubadora durante 5 minutos a 37°C en una atmósfera al 5 % de dióxido de carbono (CO_2) en una incubadora con CO_2 modelo 3403 (Thermo Scientific®), una vez transcurrido el tiempo se observó el desprendimiento de las células para posteriormente resuspenderlas en 1 mL de medio Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de una mezcla de antibiótico (10, 000 unidades de penicilina/10 mg estreptomicina/mL). La suspensión celular se centrifugó a 13, 000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos, en centrifuga refrigerada modelo Sorval (Thermo Scientific®). Se procedió a retirar el sobrenadante y el pellet se resuspendió con 5 mL de medio EMEM. Se tomaron 10 μL de la suspensión celular y se colocaron en la cámara de Neubauer para realizar el conteo de las células, una vez finalizado se ajustó la suspensión celular a 50, 000 células/mL. Para el ensayo se colocaron aproximadamente 5, 000 células por pozo en una placa de 96 pocillos, finalmente la placa se incubó durante 24 horas a 37°C en una atmósfera al 5% CO_2 [56].

Una vez transcurridas las 24 horas, se procedió a agregar los compuestos de estudio y controles a la placa de 96 pocillos. Las concentraciones para los compuestos (G-311, G-898, G-309) fueron las siguientes 0.112, 0.225, 0.45, 0.9, 1.8, 3.6, 7.2 μM .

Se procedió a realizar una solución stock de cada compuesto. En este caso se utilizó 1 mg de compuesto y 250 μL de DMSO. Una vez preparadas las soluciones stocks se tomaron 20 μL y se transfirieron a un tubo eppendorf, al cual se le agregó 480 μL de medio EMEM. Después se tomaron 100 μL de la solución y se colocaron en el primer

pocillo de la placa para posteriormente llevar a cabo una dilución seriada; dicho procedimiento se realizó para cada compuesto y con el solvente por triplicado. La placa se incubó durante 48 horas a 37°C a una atmósfera al 5% de CO₂.

Finalizado el periodo de incubación, se reemplazó el sobrenadante de la placa y se colocó en cada pocillo 10 µL de (4-[3-(4-yodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-disulfonato de benceno (WST-1) y 90 µL de medio EMEM, se incubó por 2 horas a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ para finalmente medir la densidad óptica a 450 nm con un lector de microplacas ELISA modelo ELX800 (Biotek®).

El fármaco de referencia que se utilizó fue colchicina probado a las mismas concentraciones; como control positivo tritón X-100 al 1% en PBS, como control negativo se usaron las células sin ningún tratamiento, también se utilizó como control solvente/medio EMEM a las mismas concentraciones de solvente usado para las diluciones de los compuestos y como blanco de reacción pocillos sin células, solo 95 µL de medio EMEM y 5 µL de reactivo WST-1 [56].

2.1.2. Determinación de la actividad apoptótica mediante la actividad de caspasa-3.

Se llevó a cabo la determinación de la actividad de la caspasa-3 en la línea celular de cáncer de cérvix. Se evaluaron los tres compuestos de estudio (G-311, G-898, G-309), y la colchicina; como control negativo se utilizaron las células sin ningún tratamiento y como control positivo la podofilotoxina. La concentración utilizada fue de 7.2 µM. Se colocaron en una placa de 6 pocillos aproximadamente 1, 000, 000 de células, se dejó incubando durante 24 horas a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂. Se agregó el tratamiento a cada uno de los pocillos y se dejaron incubando a 37°C en una atmósfera al

5% de CO₂ durante 7 horas, una vez transcurrido el tiempo se llevó a cabo la actividad de la caspasa-3.

Después de la incubación las células se tripsinizaron y posteriormente se centrifugaron a 13, 000 rpm durante 10 minutos. El pellet se resuspendió en 1 mL de PBS y se transfirió a un tubo eppendorf, se centrifugó a 13, 300 rpm durante 8 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se agregó a cada muestra 50 µL de buffer de lisis 1X durante 30 minutos (las muestras se mantuvieron todo el tiempo en hielo), posteriormente se centrifugó el lisado a 5000 rpm durante 5 minutos a 4°C, el sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf y se llevó a cabo la cuantificación de proteína por el método de Bradford. Una vez realizada la cuantificación se procedió a colocar la muestra y el buffer de lisis 1X en un pocillo de una microplaca a una concentración de 100 µg/mL de la proteína en un volumen final de 50 µL y a cada pocillo con muestra se agregaron 50 µL de solución de trabajo 2X (5mM Z-DEVD-R110 y buffer de reacción 2X). La enzima caspasa-3 hidroliza el sustrato Z-DEVD-R110 liberando la rodamina. Para el blanco se colocó 50 µL de buffer de lisis 1X y 50 µL de solución de trabajo 2X. Una vez colocadas las muestras en la microplaca se cubrieron y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se midió la fluorescencia con un filtro excitación/emisión 496/520 nm [57].

2.1.3. Análisis de expresión génica diferencial en la línea celular SiHa tratada con el compuesto G-898 y comparada con la colchicina.

La determinación se realizó en la línea celular SiHa. Se evaluó el compuesto G-898 y la colchicina de manera individual. Como control se utilizaron las células sin tratamiento. Se usó la concentración de 7.2 µM; se llevó a cabo el conteo celular, se colocaron 10 µL

de la suspensión celular en la cámara de Neubauer, una vez finalizado el conteo se realizó una suspensión celular que contenía 2.5 millones de células/mL. Colocando en cada frasco aproximadamente 2,000,000 células con 3 mL de medio EMEM, dejando incubar durante 24 horas a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂. Posteriormente las células fueron tratadas durante 6 horas; una vez transcurrido el tiempo se llevó a cabo la extracción del ARN.

Se retiró el medio de cada frasco y se procedió a realizar 3 lavados con PBS. Posteriormente se agregó 1000 µL de tripsina a cada frasco e incubó durante 3 minutos, una vez observado el desprendimiento celular, se agregó 2 mL de medio EMEM a cada frasco. En tubos falcón de 15 mL se transfirió el contenido de cada frasco y se procedió a centrifugar a 1,300 rpm durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y al pellet se le agregó 1 mL de PBS. Se transfirió 1 mL a un tubo eppendorf y se centrifugó a 13,300 rpm durante 8 minutos a 4°C.

La extracción del ARN se realizó de manera convencional con la técnica de trizol. Una vez centrifugadas las muestras se decantó el sobrenadante y se agregaron 500 µL de trizol, y se procedió a dar vortex durante 15 segundos. Enseguida se dejó reposar a temperatura ambiente 2 minutos. Después se agregó 500 µL de cloroformo, se dio vortex durante 15 segundos y se dejó reposar 3 minutos a temperatura ambiente. Después se centrifugó a 13,300 rpm durante 8 minutos. Se tomó la fase acuosa y se colocó en un nuevo tubo eppendorf. Se agregaron 500 µL de isopropanol y se mezcló el tubo por inversión. Se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. De nuevo se centrifugó a 13,300 rpm durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante. El pellet que se formó se lavó con 500 µL de etanol 70% procurando desprender la pastilla del tubo. Se centrifugó a 13,300 rpm durante 5 minutos. Se decantó y se absorbió todo el etanol restante y el resto se dejó secar

por 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 50 μL de agua milliQ y se disolvió la pastilla. Las muestras se almacenaron a 4°C hasta su posterior uso [56].

La integridad del ARN fue evaluada mediante un gel de agarosa al 1% disuelto en buffer TBE 1X. Se colocaron las muestras y se corrió el gel a 80 voltios (V) durante 5 minutos y posteriormente a 120 V durante 25 minutos. Se llevó a cabo la cuantificación de ARN de cada muestra por espectrofotometría. Se colocaron 2 μL de la muestra en el nanodrop 2000 (Thermo Scientific®). Se determinó la relación de la densidad óptica (DO) 260/280 para evaluar la pureza del ARN.

Posteriormente se realizó la precipitación de las muestras de ARN. Las muestras fueron transferidas a criotubos, a cada uno se le agregó 5 μL de acetato de sodio 3 molar con pH 5.2 y se mezcló perfectamente en vortex. Se añadieron 138 μL de etanol al 100% en frío y se mezclaron por inversión. Se almacenaron las muestras en congelación a -80°C hasta su uso.

Para el marcado del ARN se usaron desoxinucleótidos de timina marcados con una molécula fluorescente Alexafluor 555 para el control y el Alexafluor 647 para las muestras tratadas. Primeramente, se procedió a recuperar el ARN de la precipitación. Las muestras fueron centrifugadas a 14,000 rpm durante 15 minutos, se retiró el sobrenadante y el pellet se lavó con 500 μL de etanol al 70%, se centrifugó y se dejó secar durante 15 minutos, finalmente se resuspendió en 15 μL de agua tratada con dietilpicrocarbonato (DEPC) y se procedió a realizar un gel de agarosa al 1%, en cada pocillo se agregó 6 μL de buffer de carga el cual contenía 0.01% de bromuro de etidio y se colocó 1 μL de la muestra. El gel se corrió a 90 V durante 40 minutos.

Se continuo con el marcado de ARN por retrotranscripción (RT), en el cual se utilizaron dos mezclas. La mezcla A contenía Oligo dT 1 μ L, *random primers* 1 μ L y agua tratada con DEPC la cantidad de esta dependió de la muestra. Al final la mezcla A debe contener un volumen final de 19 μ L. En este caso a la mezcla A de la muestra control se le colocaron 6 μ L, para el de colchicina se usó 5 μ L y de compuesto G-898 5 μ L. Se mezcló varias veces e incubó a 70 °C por 10 minutos y posteriormente se colocó 5 minutos en hielo. La mezcla B contenía 5X RT buffer de reacción 8 μ L, MgCl 25 mM 2 μ L, aminoalil-DNTP 4 μ L, ditioneitol (DTT) 0.1 M 4 μ L, transcriptasa reversa superscript II (200U/ μ L) 3 μ L. Se mezcló B con A, se centrifugó e incubó durante 10 minutos a 25°C, posteriormente a 42°C toda la noche.

Después de la retrotranscripción, el ARN sobrante fue hidrolizado con 5 μ L de hidróxido de sodio (NaOH) 1 normal y 1 μ L de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.5 M y se incubó 10 minutos a 65°C. Posteriormente se agregaron 25 μ L de (4-(2-hidroxietil)-1-ácido piperazineetanosulfónico) (HEPES) 1 M con pH 7.5.

La purificación del aminoalil cDNA (aacDNA) consistió en agregarle 7 μ L de acetato de sodio 3M y 400 μ L de buffer de unión, se mezcló y colocó en una columna Qiagen®, se dejó reposar 5 minutos, posteriormente se centrifugó a 1, 400 rpm durante 1 minuto, se realizaron 3 lavados con 500 μ L de etanol al 80%, centrifugó a 14, 000 rpm por 1 minuto, se centrifugaron por 1 minuto los tubos vacíos para remover el exceso de etanol. En un tubo nuevo se recuperó de la columna al aacDNA dos veces con 30 μ L de H₂O/DEPC, se dejó en reposo 1 minuto y se centrifugó a 9, 000 rpm durante 1 minuto, se secó en una centrifuga de vacío Integrated Speedvac system modelo ISS110 (Thermo®) por 30

minutos y resuspendió en 4.5 μ L de bicarbonato de sodio 100 mM con pH 9.0 se dio vortex y dejó reposar durante 10 minutos.

Para el marcaje se disolvieron los colorantes (Alexafluor 555 y 647) con 4.5 μ L de DMSO, se dió vortex y se agregó al aacDNA purificado, se resuspendió e incubó a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 2 horas.

Al chip se le realizó un pretratamiento, el cual consistió en hidratar la laminilla exponiendo el lado impreso al vapor de agua a 60°C durante 10 segundos, se volteó para secar y volver a exponerlo al vapor, este procedimiento se realizó 3 veces. Se fijó el chip con 2 ciclos durante 1 minuto a luz ultravioleta (UV) 0.12 jxcm^2 modelo XL-1500 uv crosslinker (Spectrolinker[®]), posteriormente se prehibridizó la laminilla en buffer salino de citrato sodio (SSC) 5X, SDS 0.1%, albumina de suero bovino (BSA por sus siglas en inglés) 1%, EDTA 10 mM a 42°C durante 1 hora, después se lavó con SSC 2X, SDS 0.1% durante 3 minutos a temperatura ambiente, luego se lavó durante 3 minutos en SSC 2X, inmediatamente transcurrido el tiempo se pasó a baño de agua (H_2O)/DEPC en ebullición durante 2 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 10 segundos, finalmente se pasó a etanol al 95% frío por 2 minutos, se secó por centrifugación a 1,500 rpm durante 2 minutos.

Al aacDNA se le agregó 71 μ L de H_2O /DEPC y se añadió 8 μ L de acetato de sodio 3M y 400 μ L de binding buffer, resuspendió y aplicó la mezcla a una columna de Qiagen[®], se dejó reposar 5 min y centrifugó durante 1 minuto. Se lavó 3 veces con 500 μ L de buffer PE y centrifugó durante 1 minuto. En un tubo nuevo se recuperó de la columna el Alexa-

AcDNA dos veces con 30 μ L de H₂O/DEPC, se dejó en reposo 1 minuto y centrifugó a 9,000 rpm por 1 minuto.

Para que se lleve a cabo la hibridación se midió la concentración del cDNA de cada muestra en un espectrofotómetro NanoDrop modelo ND-1000 (Thermo Scientific®). Cada una de las muestras se ajustaron a la concentración deseada y se secaron, para disolverlas en la solución de hibridación que contenía 17.5 μ L de SSC 5X, 7 μ L de SDS 0.1%, 45.5 μ L de TE, cada una de las muestras de estudio se ajustó a unidades de pmol. Se desnaturalizó a 94°C por 5 minutos y 30 segundos a 65°C. Posteriormente se aplicó la mezcla al microarreglo cubriendo la superficie con un cubreobjetos. Se incubó por 18 horas en un baño de agua a 42°C. Finalmente se llevaron a cabo 3 lavados. El primer lavado se realizó durante 5 minutos en SSC 2X-SDS al 0.1% a 42°C y en agitación, el segundo lavado por 5 minutos en SSC 1X a temperatura ambiente y por último 5 minutos en SSC 0.5X a temperatura ambiente. Se centrifugaron a 1,500 rpm en una centrifuga modelo Allegra 6 (Beckman Coulter®) durante 2 minutos.

Una vez que el microchip se secó, se procedió a realizar la lectura con un escáner de microarreglos modelo GenePix 4100 (Molecular Devices®). Para la cuantificación de las imágenes del microarreglo, se utilizó el software GenArise. Para el análisis bioinformático de los genes sobreexpresados y reprimidos se utilizó un z-score de ± 2 desviación estándar.

El análisis se realizó con la ayuda de la base de datos DAVID (The database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) con la cual se determinó las posibles rutas biológicas que están implicadas en los genes reprimidos y sobreexpresados de dicho ensayo [56].

2.1.4. Manejo de Residuos

Los cultivos utilizados fueron esterilizados en autoclave y dispuestos en bolsas rojas para los residuos biológicos-infecciosos. En la extracción del ARN se utilizaron los siguientes solventes isopropanol, cloroformo, los cuales fueron depositados en el colector C.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1. ENSAYOS BIOLÓGICOS

3.1.1. Evaluación de la actividad anticancerígena y citotóxica *in vitro* de los compuestos en estudio por la técnica de WST-1.

3.1.1.1. Citotoxicidad de los compuestos de estudio.

Los valores de citotoxicidad de los compuestos en estudio se muestran en la tabla 7, los cuales se presentan en porcentajes de viabilidad y desviación estándar. En la figura 9 se muestran las gráficas de curvas de concentración-respuesta de los compuestos de estudio. Se realizó una comparación de medias utilizando un análisis de varianza (ANOVA) con valor de $p < 0.05$ como significativo, se compararon por separado cada compuesto a las diferentes concentraciones. También se analizaron las diferencias significativas para la concentración de 1.8, 3.6 y 7.2 μM entre los cuatro compuestos en estudio y además se realizó análisis *posthoc*, una comparación con la prueba de Fisher.

Tabla 7. Citotoxicidad de los compuestos en la línea celular Chang.

Compuesto	309	898	311	Colchicina
μM	% de Viabilidad \pm DE			
0.112	107.48 \pm 4	98.59 \pm 5	104.28 \pm 7	57.02 \pm 3
0.225	104.51 \pm 7	97.13 \pm 14	101.84 \pm 9	62.85 \pm 5
0.45	106.25 \pm 8	86.75 \pm 5	103.56 \pm 11	69.08 \pm 6
0.9	106.05 \pm 5	84.95 \pm 4	100.17 \pm 10	73.37 \pm 6
1.8	104.86 \pm 5 ^a	81.57 \pm 4 ^b	104.05 \pm 8 ^a	75.48 \pm 6 ^b
3.6	102.93 \pm 6 ^a	73.46 \pm 3 ^b	104.71 \pm 8 ^a	75.09 \pm 7 ^b
7.2	94.25 \pm 5 ^a	63.70 \pm 5 ^b	106.25 \pm 8 ^a	66.31 \pm 4 ^b

No difieren entre si el grupo a y el grupo b.

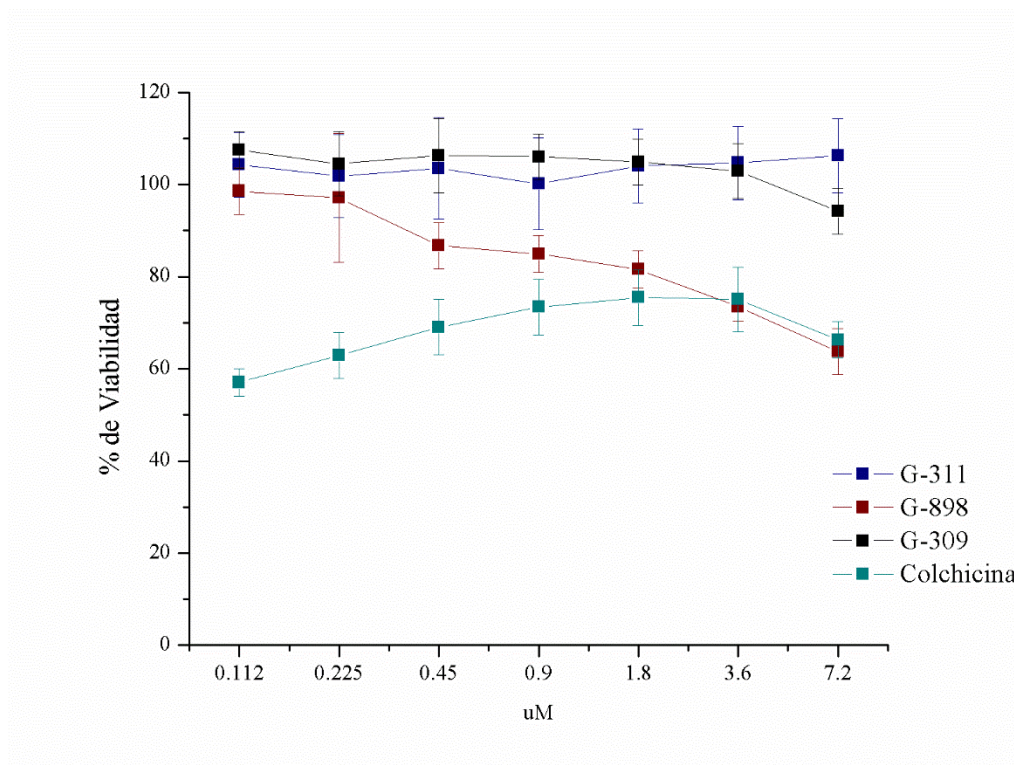


Figura 9. Citotoxicidad de los compuestos de estudio en las células Chang.

3.1.1.2. Actividad anticancerígena de los compuestos de estudio.

Resultados de la evaluación de la actividad anticancerígena de los compuestos en las líneas celulares de SiHa y MCF-7 con la técnica de WST-1. En la tabla 8 se muestran los resultados obtenidos de SiHa y en la tabla 9 los resultados de la línea celular MCF-7, los cuales se presentan en porcentajes de viabilidad y desviación estándar. En la figura 10 se muestran las gráficas de curvas de concentración-respuesta de los compuestos de estudio sobre la línea SiHa y en la figura 11 los resultados obtenidos con MCF-7. Se determinaron las diferencias significativas realizando el mismo análisis estadístico que para la actividad citotóxica.

Tabla 8. Actividad anticancerígena de los compuestos en la línea celular SiHa.

Compuesto	309	898	311	Colchicina
μM	% de Viabilidad \pm DE			
0.112	97.57 \pm 5	102.58 \pm 4	103.10 \pm 3	68.81 \pm 3
0.225	96.04 \pm 6	104.81 \pm 7	101.16 \pm 3	70.68 \pm 4
0.45	100.73 \pm 4	93.96 \pm 8	101.82 \pm 4	73.30 \pm 4
0.9	99.21 \pm 5	88.52 \pm 8	98.61 \pm 5	72.51 \pm 5
1.8	109.68 \pm 5	89.73 \pm 11	107.46 \pm 6	75.27 \pm 4
3.6	103.94 \pm 4 ^a	92.95 \pm 7 ^{a,b}	113.82 \pm 5 ^a	78.80 \pm 5 ^b
7.2	111.81 \pm 5 ^a	62.63 \pm 4 ^c	105.15 \pm 3 ^a	71.99 \pm 3 ^b

No difieren entre si el grupo a, el grupo b y el grupo c.

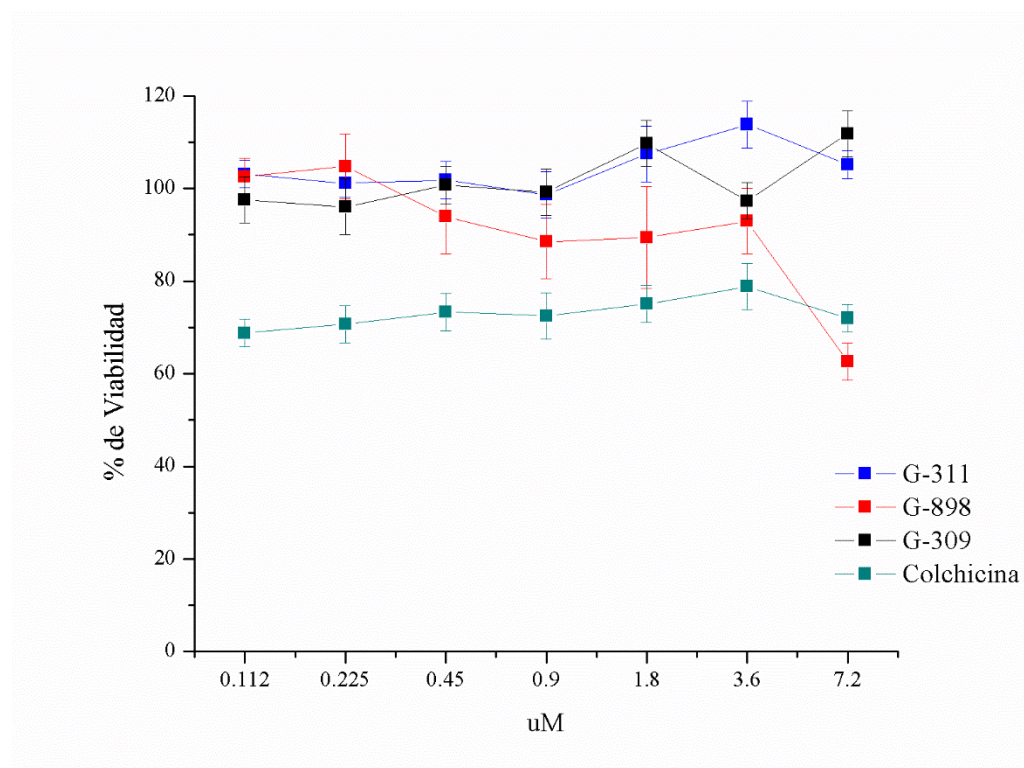


Figura 10. Actividad anticancerígena de los compuestos en las células SiHa.

Tabla 9. Actividad anticancerígena de los compuestos en la línea celular MCF-7.

Compuesto	309	898	311	Colchicina
μM	% de Viabilidad \pm DE			
0.112	107.06 \pm 5	106.69 \pm 6	100.0 \pm 6	77.88 \pm 5
0.225	110.87 \pm 6	108.64 \pm 6	102.33 \pm 4	84.23 \pm 9
0.45	111.99 \pm 5	115.53 \pm 3	112.39 \pm 3	97.45 \pm 8
0.9	114.05 \pm 6	116.39 \pm 5	113.55 \pm 3	97.78 \pm 8
1.8	117.07 \pm 3	117.41 \pm 3	117.34 \pm 3	99.40 \pm 12
3.6	119.38 \pm 3	117.18 \pm 2	116.93 \pm 4	99.92 \pm 9
7.2	109.27 \pm 4 ^a	107.62 \pm 4 ^a	110.62 \pm 3 ^a	68.15 \pm 3 ^b

No difieren entre si el grupo a y el grupo b.

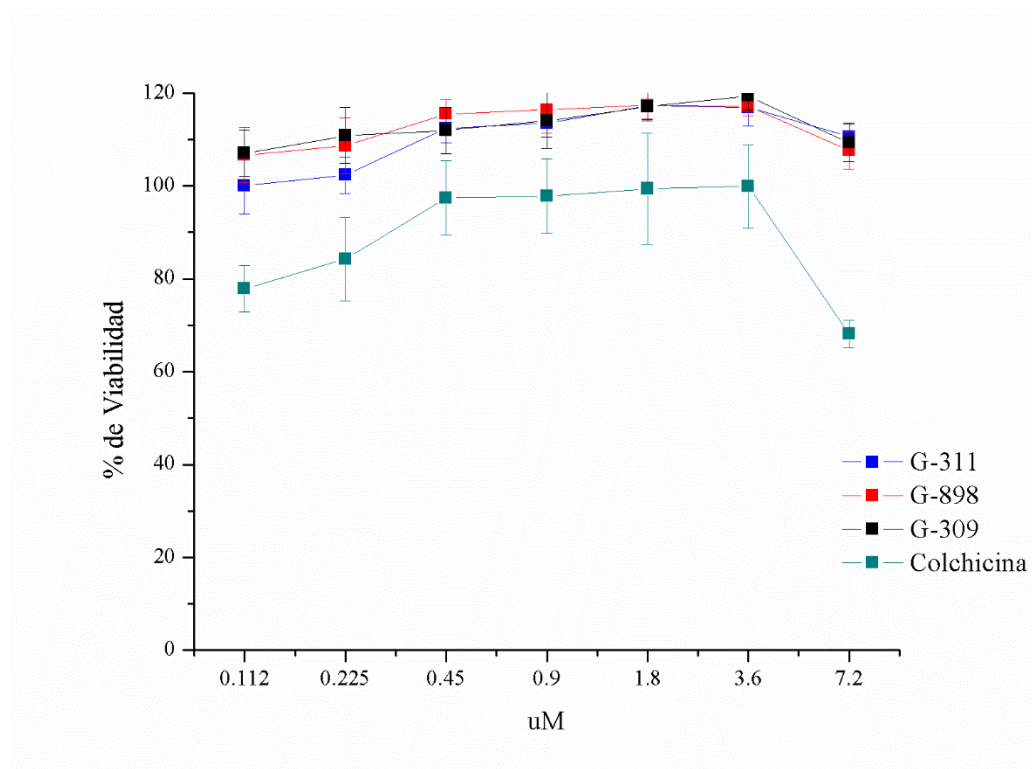


Figura 11. Actividad anticancerígena de los compuestos en las células MCF-7.

3.1.2. Determinación de la actividad apoptótica mediante la actividad de caspasa-3.

Se llevó a cabo la determinación de la actividad de caspasa-3 en la línea celular SiHa, las cuales fueron tratadas con los compuestos de estudio (G-311, G-898, G-309), colchicina, podofilotoxina a una concentración final de 7.2 μM y como control negativo las células sin tratamiento. En la tabla 10 y en la figura 12 se muestran los valores de fluorescencia (excitación/emisión 496/520 nm).

Tabla 10. Valores de fluorescencia emitidos de la rodamina liberada por la actividad de la caspasa-3.

Compuesto	Fluorescencia \pm DE
G-311	1.977 \pm 0.258
G-898	0.732 \pm 0.060
G-309	1.209 \pm 0.159
Colchicina	1.373 \pm 0.135
Podofilotoxina	1.227 \pm 0.065
Negativo	0.903 \pm 0.030

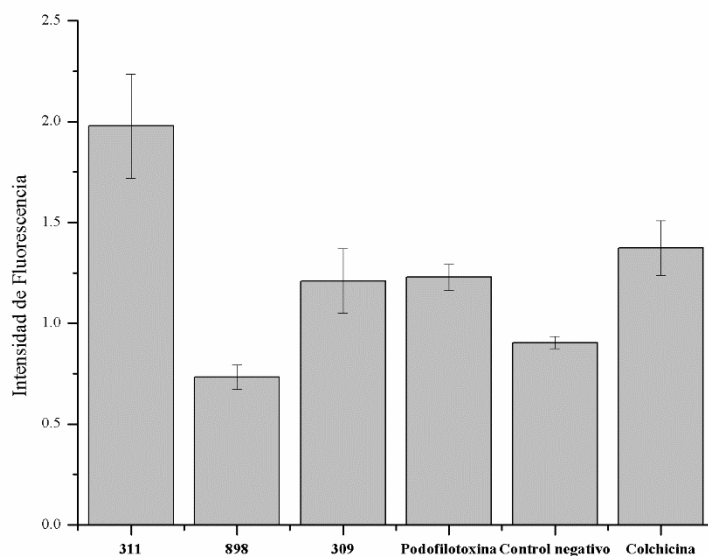


Figura 12. Valores de la actividad de la caspasa-3, inducida por el tratamiento.

3.1.3. Análisis de expresión génica diferencial en la línea celular SiHa tratada con el compuesto G-898 y comparada con la colchicina.

Se determinó el análisis de expresión génica diferencial en la línea celular SiHa, se realizaron dos tratamientos, uno con el compuesto G-898 y otro con colchicina, comparando la expresión con un control (sin ningún tratamiento). En la figura 13 se presenta el gel de agarosa al 1%, nos muestra los ARN's obtenidos después de los tratamientos; se observa una buena integridad de los ARN's. En la figura 14 y 15 se muestran los chips de ADN obtenidos.

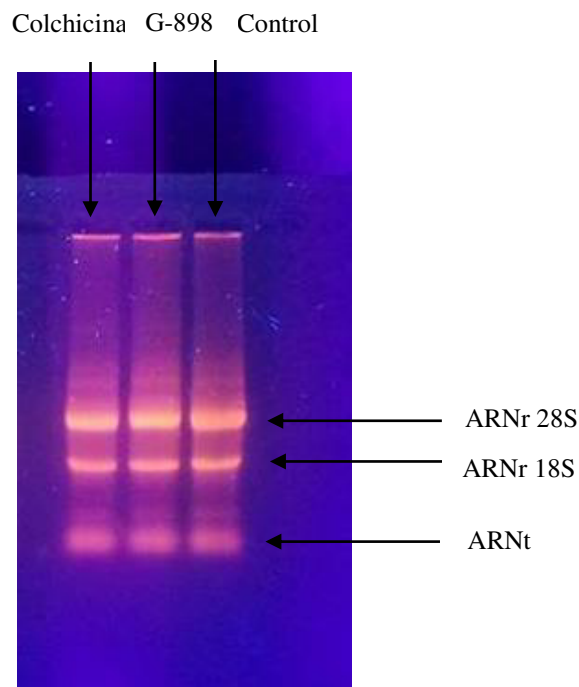


Figura 13. Gel de agarosa al 1% de los ARN's obtenidos de la extracción.

Los genes con un z-score ± 2 DE fueron considerados para el análisis bioinformático. En el tratamiento con el compuesto G-898 se encontraron 172 genes reprimidos y 236 genes sobreexpresados, y en el caso del tratamiento con colchicina se encontraron 224 genes reprimidos y 186 genes sobreexpresados. Con la ayuda de The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID), se llevó a cabo la asociación de las vías biológicas implicadas a causa del tratamiento.

Para el tratamiento con G-898, DAVID mostró 18 vías biológicas reprimidas (tablas 11 y 12) y 25 vías sobreexpresadas (tablas 13 y 14).

Tabla 11. Vías biológicas reprimidas a causa del tratamiento con el compuesto G-898.

Vía biológica	Cantidad de genes
Vías metabólicas	21
Neuroactividad de interacción ligando-receptor	6
Enfermedad de Parkinson	4
SNARE interactúan en el transporte vesicular	3
Complemento y cascada de la coagulación	3
Fosforilación oxidativa	3
Vía de señalización FoxO	3
Lupus eritematoso sistémico	3
Ribosoma	3
Vías de señalización que regulan la pluripotencia de las células madre	3
Biosíntesis de esteroides	2
Biosíntesis de glicosaminoglicanos- sulfato de heparan/heparina	2
Formación del eje dorso-ventral	2
Nicotinato y metabolismo de la nicotinamida	2
Transducción del gusto	2
Amino azúcares y metabolismo del azúcar nucleotídica	2
Infección por <i>Staphylococcus aureus</i>	2
Miocarditis viral	2

Tabla 12. Vías biológicas de interés y genes reprimidos de cada vía con el tratamiento G-898.

Vía biológica	Gen
Vías metabólicas	Ecto 5' nucleotidasa (NT5E)
	ATP sintasa, transporte de H ⁺ , complejo mitocondrial F1, subunidad delta (ATP5D)
	N-desacetilasa y N-sulfotransferasa 2 (NDST2)
	NADH: subunidad B11 de la ubiquinona oxidorreductasa (NDUFB11)
	NADH: subunidad B8 de la ubiquinona oxidorreductasa (NDUFB8)
	Nucleósido difosfato quinasa 3 NME/NM23
	UDP glucuronosiltransferasa, familia 2 miembros B15 (UGT2B15)
	Asparagina sintetasa (hidrolizadora de glutamina) (ASNS)
	Antígeno de células estromales de médula ósea 1 (BST1)
	Citocromo P450 familia 2 subfamilia R miembro 1 (CYP2R1)

Vía de señalización FoxO	Proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento (GRB2)
	Serina/Treonina cinasa 11 (STK11)
	Receptor de esfingosina-1-fosfato 4 (S1PR4)

Tabla 13. Vías biológicas sobreexpresadas a causa del tratamiento con el compuesto G-898.

Vía biológica	Cantidad de genes
Ribosoma	7
Enfermedad de Huntington	7
Infección por Herpes Simple	6
Proteoglucanos en el cáncer	6
Biosíntesis de aminoácidos	5
Moléculas de adhesión celular (CAMs)	5
Procesamiento de proteínas en retículo endoplásmico	5
Adhesión focal	5
Vía de señalización Ras	5
Interacción citocina-receptor	5
Red inmuneintestinal para producción de IgA	4
Degradación de ARN	4
Vía de señalización ErbB	4
Sinapsis glutamatérgica	4
Spliceosoma	4
Proteólisis mediada por ubiquitina	4
Miocarditis viral	3
Artritis reumatoide	3
Vía de vigilancia de ARNm	3
Metabolismo de colina en el cáncer	3
Biosíntesis de glicosaminoglicanos-sulfato de condroitina/sulfato de dermatan	2
Enfermedad de injerto contra huésped	2
Rechazo de aloinjerto	2
Diabetes mellitus tipo 1	2
Proteosoma	2

Tabla 14. Vías biológicas de interés y genes sobreexpresados de cada vía con el tratamiento G-898.

Vía biológica	Gen
Moléculas de adhesión celular	Molécula CD58 (CD58)
	Cadherina 2 (CDH2)
	Molécula de adhesión celular 1 (CADM1)
	Complejo mayor de histocompatibilidad, clase II, DQ alfa 2 (HLA-DQA2)
	Muerte celular programada 1 ligando 2 (PDCD1LG2)
Proteoglucanos en el cáncer	Rho asociados a coli de bobina que contiene la proteína quinasa 2 (ROCK2)
	Caveolin 2 (CAV2)
	Frizzled clase de receptor 1 (FZD1)
	Proteína fosfatasa 1 subunidad catalítica gamma (PPP1CC)
	Proteína tirosina quinasa 2 (PTK2)
	Proteína tirosina fosfatasa, no receptor de tipo 11 (PTPN11)
Adhesión focal	Rho asociados coil de bobina que contiene la proteína quinasa 2 (ROCK2)
	Caveolin 2 (CAV2)
	Proteína fosfatasa 1 subunidad catalítica gamma (PPP1CC)
	Proteína tirosina quinasa 2 (PTK2)
	Reelin (RELN)
Vía de señalización Ras	Proteína tirosina quinasa no receptora 2 (ABL2)
	Activador de la proteína p21 de RAS 1(RASA1)
	Angiopoyetina 1 (ANGPT1)
	Fosfolipasa A2 grupo IB (PLA2G1B)
	Proteína tirosina fosfatasa, no receptor de tipo 11 (PTPN11)
Vía de señalización ErbB	Proto-oncogen 2, no receptor de tirosina cinasa (ABL2)
	Epiregulina (EREG)
	Neuregulina 1 (NRG1)
	Proteína tirosina cinasa 2 (PTK2)

En el tratamiento con colchicina, la base de datos DAVID mostró 34 vías biológicas reprimidas (tablas 15 y 16) y 22 vías sobreexpresadas (ver tablas 17 y 18).

Tabla 15. Vías biológicas reprimidas a causa del tratamiento con colchicina.

Vías biológicas	Cantidad de genes
Procesamiento de proteínas en retículo endoplásmico	8
Neuroactividad de interacción ligando-receptor	8
Fc gamma R- mediada por fagocitosis	6
Enfermedad hepática grasa no alcohólica (NAFLD)	5
Enfermedad de Huntington	5
Vía de señalización de AMPc	5
Adhesión focal	5
Interacción ECM-receptor	4
Citotoxicidad mediada por células natural killer	4
Enfermedad de Parkinson	4
Vía de señalización del hipocampo	4
Tuberculosis	4
Reparación de escisión de base	3
Metabolismo de tirosina	3
Metabolismo de glicina, serina y treonina	3
Transducción del gusto	3
Infección por <i>Vibrio cholerae</i>	3
Infección <i>Staphylococcus aureus</i>	3
Apoptosis	3
Vía de señalización p53	3
Metabolismo de fármacos-citocromo P450	3
Metabolismo de xenobióticos por el citocromo P450	3
Adicción a la morfina	3
Señalización endocanabinoide retrógrada	3
Vía de señalización del receptor de células T	3
Amebiasis	3
Sinapsis serotoninérgica	3
Metabolismo de fenilalanina	2
Asma	2
SNARE en el transporte vesicular	2
Rechazo de aloinjerto	2
Metabolismo de cisteína y metionina	2
Adicción a la nicotina	2
Porfirina y metabolismo de la clorofila	2

Tabla 16. Vías metabólicas de interés y genes reprimidos de cada vía con el tratamiento de colchicina

Vía metabólica	Gen
Reparación de escisión de base	DNA glicosilasa 8-oxoguanina (OGG1)
	Uracil-DNA glicosilasa 1 Cadena monofuncional monocatenaria (SMUG1)
Apoptosis	Glicosilasa de ADN timina (TDG)
	BCL2 asociados X, regulador de apoptosis (BAX)
	Factor 2 asociado al receptor de TNF (TRAF2)
	Factor activador de la peptidasa apoptótica 1 (APAF1)
Vía de señalización p53	BCL2 asociados X, regulador de apoptosis (BAX)
	STEAP3 metaloreductasa (STEAP3)
	Factor activador de peptidasa apoptótica 1 (APAF1)
Adhesión focal	Colágeno tipo 1 cadena alfa 2 (COL1A2)
	Colágeno tipo II cadena alfa 1 (COL2A1)
	Integrina subunidad β 4 (ITGB4)
	P21 (RAC1) actividad quinasa 1 (PAK1)
	Factor de intercambio de nucleótidos 2 vav guanina (VAV2)

Tabla 17. Vías biológicas sobreexpresadas a causa del tratamiento con colchicina.

Vía biológica	Cantidad de genes
Interacción con el receptor de citocina	6
Spliceosoma	5
Vía de señalización de MAPK	5
Infección por HTLV-1	5
Vía de señalización del hippo	4
Enfermedad de Huntington	4
Proteosoma	3
Red inmune intestinal para producción de IgA	3
Biosíntesis de hormonas esteroideas	3
Vía de señalización PPAR	3
Linaje de células hematopoyéticas	3
Vía de señalización del receptor de células T	3
Amebiasis	3
Vía de señalización de neutrofina	3
Ciclo celular	3
Guía axón	3
Vía de señalización que regula la pluripotencia de las células madre	3
Metabolismo de la galactosa	2

Asma	2
Rechazo del aloinjerto	2
Enfermedad tiroidea autoinmune	2
Legionelosis	2

Tabla 18. Vías biológicas de interés y genes sobreexpresados de cada vía con el tratamiento de colchicina.

Vía metabólica	Gen
Vía de señalización de MAPK	Molécula CD14 (CD14)
	TAO cinasa 3 (TAOK3)
	Proteína fosfatasa 3 subunidad catalítica gamma (PPP3CC)
	Proteína ribosómica S6 cinasa A1 (RPS6KA1)
	Factor β de transformación del receptor β 1 (TGFBR1)
Ciclo celular	Detección mitótica deficiente como MAD1 (MAD1L1)
	Componente complejo de cohesina RAD21 (RAD21)
	Antígeno estromal 2 (STAG2)

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

4.1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA Y CITOTÓXICA *IN VITRO* DE LOS COMPUESTOS EN ESTUDIO POR LA TÉCNICA DE WST-1.

Colchicina es un alcaloide, se une de manera equimolar y poco reversible a la tubulina, formando un complejo tubulina-colchicina. La proteína heterodimérica α/β -tubulina forma polímeros (microtúbulos), los cuales pueden alargarse y contraerse con el fin de cambiar la estructura y función del citoesqueleto. La colchicina puede efectivamente inhibir la mitosis, sin embargo, su valor terapéutico como anticancerígeno es bajo. Es por ello que en el presente trabajo reportamos el efecto *in vitro* de nuevos compuestos que se unen al sitio de unión de la colchicina [58].

El compuesto de estudio G-898 presentó mayor citotoxicidad en comparación con G-311 y G-309. Al comparar la actividad citotóxica de G-898 con el fármaco de referencia (colchicina), se observa que los porcentajes de viabilidad muestran moderada similitud, obteniendo para colchicina 75.48%, 75.09%, 66.31% y para G-898 81.57%, 73.46%, 63.70% en las concentraciones de 1.8, 3.6 y 7.2 μM respectivamente.

La actividad anticancerígena presentada en la línea celular SiHa mostró un efecto similar a la relacionada con la citotoxicidad, a la concentración de 7.2 μM con 62.63% del compuesto G-898; nuevamente el porcentaje antiproliferativo para los demás compuestos fue menor, casi nulo. Colchicina mantuvo aproximadamente un 68% de viabilidad en ambas líneas a concentración de 7.2 μM .

Los resultados presentados en este trabajo no son similares a los reportados por otros autores, esto se puede deber a las características fisicoquímicas de los compuestos en

estudio, donde probablemente influye el valor de log P y los tipos de interacción que puedan estar presentando los compuestos con el blanco terapéutico.

En un estudio realizado por Regina y cols., (2009) en donde a seis compuestos de estudio se les realizó un modelado molecular y evaluó la inhibición de crecimiento en ciertas líneas celulares, mostrando un 50% de inhibición en líneas celulares Hela de cáncer y HCT116/chr3 de carcinoma de colon a una concentración de 0.5 μM y estos mismos compuestos en células HEK de riñón embrionario, M14 de melanoma, y U937 de linfoma de histiocitos con un IC_{50} en un rango de 0.078-0.22 μM . Sin embargo, a concentraciones de 0.3 μM dichos compuestos causan solo un 20% de la reducción en línea celular de macrófagos murinos [59]. Con estos resultados podemos observar que los compuestos de estudio (G-898, G-311 y G-309) no presentan un porcentaje de inhibición celular favorable, a las concentraciones a la que fueron evaluados.

También se ha reportado la actividad antiproliferativa de seis compuestos, donde su control es la colchicina. Las líneas celulares evaluadas fueron A431 carcinoma epidermoide, SK-OV-3 cáncer de ovario, HT 29 cáncer de colon, NCI-H460 y A549 ambas cáncer de pulmón de células pequeñas con un rango de IC_{50} 0.02-1.311 μM y para colchicina con IC_{50} 0.021-0.071 μM , estudio reportado por Xie y cols., (2011) [60].

Así mismo, Sakchaisri y cols., (2017) evaluó el compuesto STK899704 en varias líneas celulares Hela de cáncer de cérvix, MCF-7 y MDA-MB-231 cáncer de mama, HepG2 y Hep3B carcinoma hepatocelular y algunas otras líneas, también líneas celulares que sobreexpresan P-glicoproteína MCF7/ADR y K562/ADR. El compuesto en Hela inhibió el crecimiento a un IC_{50} 0.35 μM . Y en el resto de las líneas con un rango de IC_{50} 0.35-

1.54 μM . Las líneas celulares MCF7/ADR Y K562/ADR fueron resistentes a taxol, vinblastina, doxorubicina y colchicina comparada con las líneas celulares no sobreexpresadas [61].

Al comparar los compuestos con la línea celular MCF-7 no se obtienen porcentajes antiproliferativos en ninguna concentración.

En un estudio de Zhang y cols., (2006) evaluó el efecto inhibitorio del compuesto CC-5079 en varias líneas celulares entre ellas la MCF-7 de cáncer de mama, siendo uno de sus controles la colchicina. El rango de IC_{50} que presentaron fue de 0.004-0.05 μM y el control en un rango de IC_{50} 0.002-1.1 μM [50].

En otro estudio, Anne y cols., (2008) se evaluó el efecto antiproliferativo de un compuesto y fue comparado con algunos agentes de unión a la tubulina (colchicina, paclitaxel) en varias líneas celulares. El compuesto mostró alta actividad citotóxica en todas las líneas celulares. El rango de IC_{50} más bajo fue de 0.007-0.015 μM y los IC_{50} de los controles fue de 0.013-0.026 μM para colchicina y 0.002-0.013 μM para paclitaxel [51]. Los resultados obtenidos en el presente ensayo con los reportados con otros autores no son comparables. No se observa un efecto anti proliferativo de al menos un 50% en las líneas SiHa y Chang, a pesar de un amplio rango de concentraciones (0.112, 0.225, 0.45, 0.9, 1.8, 3.6, 7.2 μM) que se evaluaron en este estudio. Los compuestos estudiados no tuvieron efecto antiproliferativo en las MCF-7.

Es posible que los compuestos en estudio no presentaron actividad antiproliferativa en todas las líneas celulares debido a que, cada una tiene ciertas características fisicoquímicas y por ende los compuestos van a interaccionar químicamente diferente. Esto se puede

observar con nuestro fármaco de referencia (colchicina), presenta una variabilidad con respecto a su IC_{50} y el efecto antiproliferativo en diversas líneas celulares; es probable que se deba a sus principales sitios de unión (tubulina, citocromo P3A4 y P-glicoproteína) [62]. Así mismo se sabe que las células tienden a incrementar el flujo de salida de agentes tóxicos y por ende ocurre una reducción a nivel intracelular del fármaco, debido a una resistencia a multifármacos (MDR por sus siglas en inglés) y al incremento de la expresión de miembros de la superfamilia de transportadores ABC. Algunos de los transportadores MDR son: ABCB1 (también conocido como MDR1 o P-glicoproteína), ABCC1 (conocido como MRP1) y ABCG2 (conocido BCRP o MXR) [63].

Kavallaris y cols., (2010) menciona que los mecanismos que determinan la sensibilidad o resistencia a los agentes antimitóticos no son claros. Estudios sobre cómo están asociados estos eventos, están influenciados por la composición isotípica de la tubulina. Existen múltiples isotipos del heterodímero α - β tubulina los cuales son codificados por varios genes, localizados en diferentes cromosomas y con diversos patrones de expresión en tejidos y células [41].

Otro de los motivos por los cuales las diferentes líneas celulares presentan un diverso efecto antiproliferativo es a las mutaciones que se puedan presentar en β -tubulina. El isotipo de β 1-tubulina presenta cierta mutación que ocurre fácilmente en líneas celulares resistentes a los agentes de unión a tubulina (TBAs por sus siglas en inglés). Sin embargo, la expresión de β II -tubulina en pacientes con cáncer de mama avanzado se obtuvo una menor respuesta con docetaxel, pero en otro estudio la expresión se encontró en tejido mamario canceroso como normal [41].

4.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD APOPTÓTICA MEDIANTE LA ACTIVIDAD DE CASPASA-3.

Con respecto a los resultados mostrados en el ensayo de actividad apoptótica, el compuesto G-311 es el que presenta mayor actividad de la enzima comparada incluso con el control positivo (podofilotoxina) y el compuesto G-309 nos indica un valor de intensidad similar a la colchicina y podofilotoxina. Por lo tanto, los compuestos G-311 y G-309 indujeron apoptosis, observada por la actividad de la caspasa-3. El compuesto G-898 no muestra actividad, la intensidad de fluorescencia es incluso menor a la del control negativo (células sin tratamiento), debido a que el compuesto G-898 presentó un 37% de actividad antiproliferativa en la técnica WST-1, se podría considerar que el mecanismo del daño a la célula sea por necrosis y no por apoptosis, sin embargo, se requieren de estudios para confirmar tal suposición.

En un estudio presentado por Henderson y cols., (2009) analizó tres líneas celulares, estas fueron incubadas a las 24 y 48 horas después del tratamiento a una concentración de 0.5 μ M. Mostraron una alta evidencia de apoptosis, incluso la línea celular que mostró ser menos sensible en el ensayo de actividad citotóxica [52]. Con estos resultados, nos damos cuenta que hay cierta similitud con los que obtuvimos con el compuesto G-311, debido a que fue el que presentó mayor intensidad de fluorescencia en el ensayo de caspasa-3, pero en la actividad anticancerígena y citotóxica presentó poco efecto. Con esta evidencia se puede volver a realizar el ensayo apoptótico, a diferentes tiempos después de aplicado el tratamiento y así observar el comportamiento a un mayor tiempo de exposición.

Por otra parte, Kavallaris y cols., (2010) hace mención que existen compuestos que se unen al sistema de tubulina-microtúbulo, provocando el bloqueo o retraso de ciertas fases

de la mitosis. La detención mitótica conduce a muerte celular, pero dichos procesos son poco claros, debido a que datos de diversos ensayos son contradictorios, por los problemas relacionados con las diferencias en las líneas celulares, las concentraciones de los fármacos utilizados y el tipo de ensayo [41]. En estudios recientes utilizaron imágenes de células *in vivo*, para conocer el efecto de los agentes antimitóticos. Las células cancerosas son más susceptibles a la muerte celular que las células normales, sin embargo, la duración de la detención mitótica y la magnitud de muerte varía entre las células cancerosas y no transformadas. Un estudio de 13 líneas celulares cancerígenas y 2 líneas celulares no transformadas mostraron una amplia variación entre las líneas celulares e incluso la misma línea en respuesta a fármacos antimitóticos (paclitaxel) [41, 64].

4.3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL EN LA LÍNEA CELULAR SIHA TRATADA CON EL COMPUESTO G-898 Y COMPARADA CON LA COLCHICINA.

El análisis de la expresión génica se realizó con el compuesto G-898 y el fármaco de referencia colchicina. Se hizo el análisis bioinformático de los tratamientos, los cuales presentaron un patrón de expresión, compartiendo cuatro vías biológicas (SNARE en el transporte vesicular, enfermedad de Parkinson, transducción del gusto y neuroactividad de interacción ligando-receptor) para los genes reprimidos, y cuatro vías biológicas para los genes sobreexpresados (Proteosoma, spliceosoma, enfermedad de Huntington y rechazo de aloinjerto).

El estudio de Lu y cols., (2012) realizó una revisión de los compuestos que han sido reportados en años anteriores y que tienen interacción con el sitio de unión de la colchicina. En esa misma revisión se describe el sitio de la colchicina y hacen referencia

a la variabilidad de los compuestos en cuestión de actividad y estructura [42]. Por lo tanto, se considera que la diferencia de ambos tratamientos sea por la forma de interacción en el sitio de unión, estructura y por la capacidad del compuesto de atravesar membranas.

Uno de los genes reprimidos en el compuesto G-898 fue la proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento (GRB2 por sus siglas en inglés) en la vía de señalización FoxO. Este gen es un adaptador que no presenta actividad enzimática intrínseca, se expresa en todas las células eucariotas, forma complejos con varias proteínas como tirosina/cinasa, receptores tirosina/cinasa, fosfatasa y andamios intracelulares. En la membrana plasmática conduce a la activación de cinasa de proteína activada por mitógeno (MAPK por sus siglas en inglés), por ende, lleva a mecanismos que controlan la transducción de señales, las cuales son vitales para la regulación de la respuesta celular. La fosforilación de la tirosina 160 sobre Grb2 es fácilmente detectable en las formas malignas de los cánceres humanos de próstata, colon y mama. Se cree que la autoasociación/disociación de Grb2 representa un interruptor regulador de la actividad de MAPK y por tanto, controla la progresión del cáncer [65].

De las vías sobreexpresadas en G-898 fue la de adhesión focal; la cinasa de adhesión focal (FAK por sus siglas en inglés) pertenece al miembro de la familia de proteínas no receptoras de tirosina/cinasa (NRPTKs por sus siglas en inglés) en el citoplasma, la sobreexpresión de FAK y un aumento de fosforilación puede iniciar múltiples vías de señalización, particularmente la regulación de la migración celular mediante la señalización de integrinas a través de FAK está establecida que contribuye a la patogénesis del cáncer [66].

Otro de los genes sobreexpresados con el tratamiento G-898 es proteína tirosina cinasa no receptora 2 (ABL2) de la vía de señalización Ras. ABL2 es un regulador esencial de muchas funciones celulares incluyendo la proliferación celular, adhesión, y migración a través de la remodelación de la estructura de actina del citoesqueleto en respuesta a estimulación de receptores [67].

El gen factor 2 asociado al receptor de factor de necrosis tumoral (TRAF2) se encontró en la vía de apoptosis de manera reprimida con el tratamiento con colchicina. Dicho gen tiene como función mediar la vía de señalización del receptor del factor de necrosis tumoral para la activación de algunos factores de transcripción NF- κ B y JNKs. TRAF2 bloquea la actividad de AP-1 la cual es inducida por el receptor de factor de crecimiento. Se ha encontrado el gen sobreexpresado en cáncer de colon [68].

Para el tratamiento con colchicina uno de los genes sobreexpresado fue el de la proteína cinasa S6 ribosómica A1 (RPS6KA1), perteneciente a la vía MAPK, este gen participa en diversos procesos celulares como lo son proliferación, supervivencia, crecimiento, motilidad y la regulación de algunos factores de transcripción. Esta proteína regula directamente el proceso de progresión del ciclo celular [69].

Otro gen sobreexpresado con colchicina fue el de detención mitótica deficiente 1 (MAD1L1) perteneciente a la vía biológica de ciclo celular. Su función principal es la regulación de la segregación cromosómica y también interactúa con algunas regiones promotoras, la sobreexpresión de la proteína acelera procesos de migración celular [70].

Con el estudio presentado podemos decir que nuestros resultados de dicho ensayo no son comparables, debido a que los genes sobreexpresados y reprimidos del compuesto G-

898 no muestran una alta similitud, sin embargo, se presentan otras vías (adhesión focal, vía de señalización Ras, moléculas de adhesión celular) que de manera indirecta pueden activar la apoptosis o algún otro mecanismo relacionado con el ciclo celular, mitosis y procesos antiproliferativos.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

- La citotoxicidad del compuesto G-898 a concentraciones de 1.8, 3.6 y 7.2 μM es comparable con colchicina.
- El compuesto G-898 presentó actividad anticancerígena y citotóxica a una concentración de 7.2 μM .
- Los compuestos G-311 y G-309 no mostraron citotoxicidad, ni actividad antiproliferativa a las concentraciones de estudio.
- Los compuestos en estudio no mostraron tener mejor potencial como anticancerígeno comparados con la colchicina.
- El compuesto G-898 no indujo apoptosis.
- El compuesto G-311 indujo apoptosis.
- Los patrones de expresión génica de los tratamientos con G-898 y colchicina presentan una variación considerable.

CAPÍTULO 6

PERSPECTIVAS

Los compuestos de estudio G-898, G-311 y G-309 no presentaron una actividad anticancerígena en las líneas celulares SiHa cáncer de cérvix y MCF-7 cáncer de mama, es por ello que sería bueno llevar a cabo la evaluación en nuevas líneas celulares cancerígenas y realizar algunas modificaciones estructurales al compuesto G-898 por medio de síntesis química con la finalidad de comparar los efectos y así poder descartar que los compuestos no presentan actividad.

Además de probar la actividad en nuevas líneas celulares, se considera que es importante incluir en el estudio ensayos que evalúen la inhibición de la polimerización de tubulina y la unión competitiva al sitio de la colchicina. También es importante analizar los patrones de expresión génica con la técnica cuantitativa de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR).

CAPÍTULO 7

DIFUSIÓN

- Participación en la modalidad de cartel en el III Simposio Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina y I Simposio Nacional de Microbiología Aplicada titulado “Descubrimiento de nuevas moléculas con afinidad al sitio de unión de la colchicina en la β -tubulina por screening virtual basado en la estructura”.
- Participación en la modalidad de cartel en el IV Simposio Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina y II Simposio Nacional de Microbiología Aplicada titulado “Evaluación in vitro de la actividad anticancerígena de nuevas moléculas con afinidad al sitio de unión de la colchicina en la β -tubulina en líneas celulares”.

REFERENCIAS

1. Van, A. The cancer genome: from structure to function. Cell Oncol. Vol. 37. 155-165. **2014.**
2. Roos, W., Thomas, A., y Kaina, B. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. Nature Reviews Cancer. Vol. 16. **2016.**
3. Organización Mundial de la Salud. Nota descriptiva. Última revisión febrero 2017. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/> (consultado mayo 2017).
4. Organización Mundial de la Salud. http://www.who.int/cancer/country-profiles/mex_en.pdf (Consultado en marzo de 2017).
5. Otto, T., y Sicinski, P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. Nature Reviews Cancer. Vol. 17. **2017.**
6. Negrini, S., Gorgoulis, V., y Halazonetis, T. Genomic instability – an evolving hallmark of cancer. Nature Reviews Molecular Cell Biology. Vol. 11. **2010.**
7. Karp, G. Biología Celular y Molecular. Conceptos y experimentos. Quinta edición. Mc Graw Hill. **2009.**
8. Vogelstein, B., y Kinzler, K. Cancer genes and the pathways they control. Nature Medicine. Vol. 10. **2004.**
9. Biswas, S., y Mallikarjuna, R. Epigenetics in cancer: Fundamentals and Beyond. Pharmacology and Therapeutics. **2017.**
10. Luo, J., Solimini, N., y Elledge, S. Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. Cell. Vol.136. **2009.**

11. Meng, X., Zhong, J., Liu, S., et al. A new hypothesis for the cancer mechanism. *Cancer Metastasis Rev.* Vol. 31. 247-268. **2012.**
12. Roussos, E., Condeelis, S., Patsialou A. Chemotaxis in cancer. *Nature Reviews Cancer.* Vol. 11. **2011.**
13. Cree, I., y Charlton, P. Molecular chess? Hallmarks of anti-cancer drug resistance. *BioMed Central.* Vol. 17. **2017.**
14. Maciejowski, J., y de Lange, T. Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* **2017.**
15. Tubbs, A., y Nussenzweig, A. Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer. *Cell.* **2017.**
16. Reha, K. *Mutagens.* Elsevier. Vol. 3. **2013.**
17. Bartek, J., Lukas, C., Lukas, J. Checking on DNA damage in S phase. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* Vol. 5. **2004.**
18. Cline, S., Hanawalt, P., Who's on first in the cellular response to DNA damage?. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* Vol. 4. **2003.**
19. Brnzei, D., Foiani, M., Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* Vol. 9. **2008.**
20. Lyn, C., y Ho, S. Developmental reprogramming of cancer susceptibility. *Nature Reviews Cancer.* **2012.**
21. Jeggo, P., Pearl, L., y Carr, A. DNA repair, genome stability and cancer: a historical perspective. *Nature Reviews Cancer.* Vol. 16. **2016.**
22. Moore, P., y Chang Y. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. *Nature Reviews Cancer.* Vol. 10. **2010.**
23. Holliday, R. The Inheritance of Epigenetic Defects. *Science.* Vol. 238. **1987.**

24. Hitchins, M. Constitutional epimutation as a mechanism for cancer causality and heritability?. *Nature Reviews Cancer*. **2015**.
25. Nguyen, Q., y Tsien, Y. Fluorescence-guided surgery with live molecular navigation-a new cutting edge. *Nature Reviews Cancer*. **2013**.
26. Holohan, C., Van, S., y Longley B. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nature Reviews Cancer*. Vol. 13. **2013**.
27. Allan, J., y Travis, L. Mechanisms of therapy-related carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer*. Vol. 5. **2005**.
28. Chan, K., Koh, C., Li, H. Mitosis-targeted anti-cancer therapies: where they stand. *Cell death and Disease*. **2012**.
29. Zhang, J., Yang, P., Gray, N. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nature Reviews Cancer*. Vol.9. **2009**.
30. Marks, P., Rifkind, R., Richon, V. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nature Reviews Cancer*. Vol. 1. **2001**.
31. Newhauser, W., y Durante, M. Assessing the risk of second malignancies after modern radiotherapy. *Nature Reviews Cancer*. Vol. 11. **2011**.
32. Beelen, K., Zwart, W., Linn, S. Can predictive biomarkers in breast cancer guide adjuvant endocrine therapy?. *Nature Reviews Clinical Oncology*. Vol. 9. **2012**.
33. Baumann, M., Krause, M., Overgaard, J. Radiation oncology in the era of precision medicine. *Nature Reviews Cancer*. Vol. 16. **2016**.
34. Sharma, P., Wagner, K., Wolchok, J. Novel cancer immunotherapy agents with survival benefit: recent successes and next steps. *Nature Reviews Cancer*. Vol. 11. **2011**.

35. Prota, E., Franck, D., Bachmann, F. The novel microtubule-destabilizing drug BAL27862 binds to the Colchicine site of tubulin with distinct effects on microtubule organization. *J. Mol. Biol.* Vol. 426. 1848-1860. **2014**.
36. Akhmanova, A., Steinmetz, M. Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nature reviews. Molecular Cell Biology.* Vol 16. **2015**.
37. Wang, Y., Zhang, H., Gigant, B. Et al. Structures of a diverse set of colchicine binding site inhibitors in complex with tubulin provide a rationale for drug discovery. *FEBS Journal.* **2015**.
38. Chandrasekaran, G., Tátrai, P., Gergely, F. Hitting the brakes: targeting microtubule motors in cancer. *British Journal of Cancer.* Vol. 113. 693-698. **2015**.
39. Ann, M., y Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer.* Vol.4. **2004**.
40. Galjart, N. Plus-End-Tracking Proteins and Their Interactions at Microtubule Ends. *Current Biology.* Vol. 20. **2010**.
41. Kavallaris, M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nature Reviews Cancer.* Vol. 10. **2010**.
42. Yan, L., Jianjun, C., Min, X., *et al.* An Overview of Tubulin Inhibitors That Interact with the Colchicine Binding Site. *Pharm Res.* Vol. 29. 2943-2971. **2013**.
43. Dumontet, C., y Ann, M. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery.* Vol. 9. **2010**.
44. Ravelli, R., Gigant, B., Curmi, P., Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature.* Vol. 428. **2004**.
45. Hamel, E., Bai, R., Covell, D. Mapping the Binding Site of Colchicinoids on β -Tubulin. 2-Chloroacetyl-2-demethylthiocolchicine covalently reacts predominantly

- with cysteine 239 and secondarily with cysteine 354. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 275. 40443-40452. **2000**.
46. Gussio, R., Luong, T., McGrath, C. A Common Pharmacophore for a Diverse Set of Colchicine Site Inhibitors Using a Structure Based Approach. *J Med Chem*. Vol. 48. 6107-6116. **2005**.
47. Ruan, B., Lu, X., y Tang, J. Synthesis, biological evaluation, and molecular docking studies of resveratrol derivatives possessing chalcone moiety as potential antitubulin agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. Vol. 19. 2688-2695. **2011**.
48. Stanton, R., Gernert, K., y Nettles, J. Drugs That Target Dynamic Microtubules: A New Molecular Perspective. *Med Res Rev*. Vol. 31. 443-481. **2011**.
49. Rustin, G., Shreeves, G., Nathan, P. A Phase Ib trial of CA4P (combrestastatin A-4 phosphate), carboplatin, and paclitaxel in patients with advanced cancer. *British Journal of Cancer*. Vol. 102. 1355-1360. **2010**.
50. Zhang, L., Wu, L., y Raymon, H. The Synthetic Compound CC-5079 Is a Potent Inhibitor of Tubulin Polymerization and Tumor Necrosis Factor- α Production with Antitumor Activity. *Cancer Res*. Vol. 66. **2006**.
51. Liberatore, A., Coulomb, H., y Pons, D. IRC-083927 is a new tubulin binder that inhibits growth of human tumor cells resistant to standard tubulin-binding agents. *Mol Cancer Ther*. Vol. 7. **2008**.
52. Henderson, M., Shaw, Y., y Wang, H. UA62784; a novel inhibitor of CENP-E kinesin-like protein. *Mol Cancer Ther*. Vol. 8. 36-44. **2009**.
53. Mooberry, S., Weiderhold, K., Dakshanamurthy, S. Identification and Characterization of a New Tubulin-Binding Tetrasubstituted Brominated Pyrrole. *Mol Pharmacol*. Vol. 72. 132-140. **2007**.

54. Zhang, Z., Meng, T., y Yang, N. MT119, a new planar-structured compound, targets the colchicine site of tubulin arresting mitosis and inhibiting tumor cell proliferation. *Int. J. Cancer*. Vol. 129. 214-224. **2011**.
55. Olazán. F., García, C., Bandyopadhyay, D. Theoretical and experimental study of polycyclic aromatic compounds as β -tubulin inhibitors. *J Mol Model*. Vol. 23. **2017**.
56. Arredondo, E., López, S., Ramírez, M. Synthesis and photodynamic activity of unsymmetrical A₃B tetraarylporphyrins functionalized with L-glutamate and their Zn (II) and Cu (II) metal complex derivatives. *Biomedicine & pharmacotherapy*. Vol. 82. 327-336. **2016**.
57. Chen, S., Guy, H., Evans, D. FAM129B/MINERVA, a Novel Adherens Junction-associated Protein, Suppresses Apoptosis in HeLa Cell. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 286. 10201-10209. **2011**.
58. Terkeltaub, R. Colchicine Upfate:**2008**.
59. Regina, G., Sarkar, T., Bai, R. New Arylthioindoles and Related Bioisosteres at the Sulfur Bridging Group.4. Synthesis, Tubulin Polymerization, Cell Growth Inhibition, and Molecular Modeling Studies. *J Med Chem*. Vol. 52. 7612-7527. **2009**.
60. Xie, F., Zhao, H., Li, D. Synthesis and Biological Evaluation of 2,4,5-Substituted Pyrimidines as a New Class of Tubulin Polymerization Inhibitors. *J. Med. Chem*. Vol.54. 3200-3205. **2011**.
61. Sakchaisri, K., Kim, S., Hwang, J. Anticancer activity of a novel small molecule tubulin inhibitor STK899704. *Plos One*. **2017**.

62. Slobodnick, A., Shah, B., Pillinger, M. Colchicine: Old and new. *The American Journal of Medicine*. Vol. 128. **2015**.
63. Fletcher, J., Haber, M., Henderson, M. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nature Reviews Cancer*. Vol.10. **2010**.
64. Gascoigne, K., Taylor, S. Cancer cells display profound intra-and interline variation following prolonged exposure to antimitotic drugs. *Cancer Cell*. Vol. 14. 111-122. **2008**.
65. Ahmed, Z., Timsah, Z., Suen, K. Grb2 monomer-dimer equilibrium determines normal versus oncogenic function. *Nature Communications*. **2015**.
66. Han, X., Xue, L., Zhou, L. The role of PTPN13 in invasion and metastasis of lung squamous cell carcinoma. *Experimental and Molecular Pathology*. Vol. 95. 270-275. **2013**.
67. Qiang X., Zhang, Z., Liu, Q. miR-20a promotes prostate cancer invasion and migration through targeting ABL2. *Journal of Cellular Biochemistry*. Vol. 115. 1269-1276. **2014**.
68. Peng, C., Zhu, F., Wen. W. Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor Family Protein 2 Is a Key Mediator of the Epidermal Growth Factor-induced Ribosomal S6 Kinase 2/cAMP-responsive Element-binding Protein/Fos Protein Signaling Pathway. *The journal of biological chemistry*. Vol. 287. 25881-25892. **2012**.
69. Nam, H., Lee, I., Jang, S. p90 ribosomal S6 kinase 1 (RSK1) isoenzyme specifically regulates cytokinesis progression. *Cellular Signalling*. Vol. 26. 208-219. **2014**.

70. Wan, J., Zhu, F., Zasadil, L. A golgi localized pool of the mitotic checkpoint component Mad1 controls integrin secretion and cell migration. *Curr Biol.* Vol. 22. 2687-2692. **2014.**

APÉNDICE A

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

Amortiguador PBS 1X

Disolver 8 g de NaCl, 1.44 g de Na₂HPO₄, 0.2 g de KCl y 0.24 g de KH₂PO₄ en 900 mL de agua destilada, ajustar el pH a 7.4, aforar a 1 L y esterilizar por autoclave.

Buffer de lisis IX

Disolver 50 µL de buffer de lisis 20X en 950 µL de agua destilada.

Buffer de reacción 2X

Mezclar 400 µL de buffer de reacción 5X, 10 µL de DTT 1M y 590 µL de agua destilada.

Buffer salino de citrato sodio (SSC 20X)

Disolver 175.3 g de NaCl 3M, 88.2 g citrato de sodio dihidratado 300mM en 800 mL de agua destilada, ajustar el pH a 7 y aforar a 1 L. Almacenar a 4°C.

Etanol al 70%

Mezclar 365 mL de etanol al 96% y 135 mL de agua destilada.

Gel de agarosa al 1%

Disolver 0.3 g de agarosa en 30 mL de TBE IX.

Medio EMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%

Disolver 9.53 g de medio EMEM, 1.2 g de NaHCO_3 , 1 mL de antibiótico (penicilina/estreptomicina), 100 mL de suero fetal bovino en 700 mL de agua destilada, ajustar pH a 7.4 y aforar a 1 L. Filtrar, dejar a prueba de esterilidad y almacenar a 4°C.

Mezcla A

Agregar 6 μL de ARN total, 1 μL de oligo dT (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 1 μL random primers (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y 11 μL de agua bidestilada.

Mezcla B

Se agrega 8 μL de buffer de reacción 5X RT, 2 μL MgCl (25mM), 4 μL de aminoallil-dNTP, 4 μL de DTT (0.1M), 3 μL de transcriptasa reversa superScrip II (200U/ μL).

Reactivo Bradford 5X

Se disuelve 0.05 g de azul brillante de Coomassie G-250, 25 mL de etanol absoluto, 50 mL de ácido fosfórico aforar a 500 mL de agua destilada; se vacía a un frasco color ámbar y se deja en agitación toda la noche, guardar a 4°C. Para utilizar el reactivo debe estar a IX.

Solución de hibridación

Agregar 25 pmol de Alexa 555, 25 pmol de Alexa 647, 17.5 μL de SSC 5X, 7 μL de SDS 0.1%, 45.5 μL de TE.

Solución de trabajo 2X

Disolver 10 μL de Z-DEVD-R110 5mM y 990 μL buffer de reacción 2X.

TBE 10X

Se disuelven 108 g de Tris 0.8M, 55 g de ácido bórico 0.89M y 9.3 g de EDTA 25mM en 800 mL de agua destilada, ajustar a 1 L.

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Elizeth Pioquinto Avila

Candidato para el grado de

Maestría en Ciencias con Orientación en Farmacia

**TESIS: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA Y
CITOTÓXICA DE MOLÉCULAS CON AFINIDAD AL SITIO DE UNIÓN DE
LA COLCHICINA EN LA B-TUBULINA.**

Campo de estudio: Ciencias de la salud

Biografía:

Datos personales: Nacida en Chilpancingo, Guerrero el 21 de Marzo de 1989, hija de María del Carmen Avila Pastor.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Guerrero, grado obtenido Licenciatura de Químico Farmacéutico Biólogo en 2014.